



Une approche fonctionnelle des relations plantes-microorganismes dans le cadre du cycle de l'azote. Cas des prairies de montagnes.

Nicolas Legay

► To cite this version:

Nicolas Legay. Une approche fonctionnelle des relations plantes-microorganismes dans le cadre du cycle de l'azote. Cas des prairies de montagnes.. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV016 . tel-00951131

HAL Id: tel-00951131

<https://theses.hal.science/tel-00951131>

Submitted on 24 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biodiversité-Ecologie-Environnement**

Présentée par

Nicolas LEGAY

Thèse dirigée par **Sandra LAVOREL** et **Jean-Christophe CLEMENT**

préparée au sein du **Laboratoire d'Ecologie Alpine**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du vivant**

Une approche fonctionnelle des relations plantes- microorganismes dans le cadre du cycle de l'azote. Cas des prairies de montagnes

Thèse soutenue publiquement le **03 juillet 2013**,
devant le jury composé de :

Johannes CORNELISSEN

Professeur à l'université d'Amsterdam, Pays-Bas (Rapporteur)

Jean-Christophe LATA

Maître de Conférence à l'université Paris VI, France (Rapporteur)

Juliette BLOOR

Chargé de recherche à l'INRA, Clermont-Ferrand, France (Examinatrice)

Dario FORNARA

Maître de Conférence à l'université d'Ulster, Royaume-Uni (Examinateur)

Christiane GALLET

Professeur à l'université de Chambéry, France (Examinatrice)

Irène TILL-BOTTRAUD

Directrice de recherche au CNRS, Grenoble, France (Examinatrice)

Sandra LAVOREL

Directrice de recherche au CNRS, Grenoble, France (Directrice de thèse)

Jean-Christophe CLEMENT

Maître de Conférence à l'université de Grenoble, France (Co-Directeur de thèse)



RESUME

Une approche fonctionnelle des relations plantes-microorganismes dans le cadre du cycle de l'azote. Cas des prairies de montagnes.

Les communautés végétales sont en relations étroites avec les communautés microbiennes des sols avec lesquelles des interactions symbiotiques ou encore compétitives pour les ressources peuvent se développer. Les traits fonctionnels végétaux ont souvent été utilisés pour comprendre ces relations et ont mis en évidence, par exemple, des effets de la litière végétale ou de l'exsudation racinaire de composés carbonés par les plantes sur les communautés microbiennes. Cependant, peu d'études ont pris en compte à la fois les traits fonctionnels foliaires et les traits fonctionnels racinaires pour comprendre les relations plantes-microorganismes.

Mes travaux de recherche se sont appuyés sur une approche fonctionnelle des traits végétaux aériens et racinaires et des paramètres microbiens du cycle de l'azote. Mon objectif principal était de comprendre les mécanismes fins impliqués dans les relations plantes-microorganismes et leurs impacts sur le fonctionnement des écosystèmes. Ces recherches ont largement bénéficiées d'une organisation des expérimentations selon un gradient d'échelles imbriquées allant de l'individu à l'écosystème, en passant par des communautés artificielles en conditions semi-contrôlées. Les techniques mises en œuvre ont fait appel, entre autres, au traçage isotopique des flux d'azote inorganique, aux mesures d'activités enzymatiques et aux abondances des gènes clés du cycle de l'azote.

J'ai pu mettre à jour d'étroites relations entre les traits fonctionnels végétaux et les paramètres fonctionnels microbiens. J'ai établi que les traits fonctionnels racinaires étaient les traits végétaux majoritairement impliqués dans les relations avec les communautés microbiennes liées aux cycles de l'azote, notamment avec les communautés dénitrifiantes. J'ai également mis en évidence que le fonctionnement des écosystèmes était le résultat de l'influence des interactions entre les communautés végétales et microbiennes, et que l'influence de l'un ou l'autre des groupes était modulée par la disponibilité en nutriment du milieu. Enfin, l'ensemble de mes résultats suggèrent que les réponses des espèces végétales à la disponibilité en nutriment, influencent en retour les communautés microbiennes impliquées dans le cycle de l'azote pour favoriser soit la circulation soit la rétention des nutriments azotés.

ABSTRACT

A functional approach of plant-microbe relationships in the context of nitrogen cycling. Case of mountain grasslands.

Plant communities are strongly linked with soil microbial communities with which symbiotic or resource competitive interactions can occur. Plant functional traits have been often used to understand these relationships and have highlighted, for example, plant litter or root exudate effects on soil microbial communities. However, few studies have taken into account both leaf and root functional traits to understand plant-microbe relationships.

My research works have used a functional approach of aboveground and belowground plant traits and microbial functional parameters of nitrogen (N) cycle. My main objective was to understand subtle mechanisms implied in plant-microbes relationships and their impacts on ecosystem functioning. These researches have greatly benefited from experiments with a gradient of nested scales ranging from individual to ecosystem, with a step using artificial plant communities in controlled conditions. Methodologies used were varied with isotope labeling of nitrogen fluxes, enzymatic activities and abundances of key genes of N cycling.

I have shown close relationships between plant functional traits and microbial functional parameters. I found that root functional traits were plant functional traits which are mainly implied in relationships with microbial communities related to N cycling and particularly those having denitrifying activities. I have also shown that ecosystem functioning is the results of the influence of plant and microbial interactions, and that the influence of one or other was modulated by soil nutrient availability. Finally, my results suggest that responses of plant species to nutrient availability, in turn influence microbial communities related to N cycling to favor either recycling or retention of nitrogen nutrients.

REMERCIEMENTS

Lorsque l'on arrive à cette partie dans la rédaction d'une thèse, c'est que le marathon mais surtout le sprint final si intense est terminé. C'est à la fois un aboutissement de quatre ans de travail et un soulagement d'avoir tenu jusqu'au bout sans craquer. Bien qu'au moment où j'écris ces lignes, j'ai encore en tête ces derniers moments difficiles, je n'oublie pas que ma thèse a surtout été une aventure humaine intense. Sortir de ma campagne normande m'a permis de rencontrer de nombreuses personnes diverses et variées, de voyager en Europe à de nombreuses reprises et de découvrir une région magnifique. L'accueil que j'ai reçu à la fois au laboratoire et à la station alpine a été très chaleureux et ne me laisseront que de très bons souvenirs..., MERCI à tous.

Dans un premier temps, je souhaite remercier les personnes qui m'ont donné goût à la recherche, mes professeurs et encadrants de l'université de Caen et notamment du laboratoire EVA. Merci à Emmanuelle, Servane, JB et Philippe avec qui j'ai fait mes premiers pas dans la recherche, qui m'ont appris les bases du métier et cet acharnement à comprendre le fonctionnement du vivant. Je les remercie également de m'avoir incité à contacter Sandra et d'avoir appuyé ma demande.

Pour ces bons moments passés à Grenoble, je remercie tout particulièrement Sandra et JC qui m'ont donné la chance et l'opportunité de travailler avec eux. Grâce à eux, j'ai effectué mes travaux de thèse dans de très bonnes conditions et avec des échanges scientifiques et humains très enrichissants.

Merci à Sandra, de m'avoir fait confiance malgré un anglais très limité et de m'avoir permis de « grandir » au sein d'un projet avec autant de chercheurs de qualité. Merci de m'avoir appris les secrets de l'écologie fonctionnelle et convaincu qu'une maîtrise minimum de méthodes statistiques « complexes » est essentielle.

Merci à JC pour son soutien quotidien et ses encouragements dans les moments de stress en me convaincant que « se faire dessus » était un passage obligé dans de nombreuses situations. Merci de

m'avoir appris toutes les bases nécessaires à la compréhension du fonctionnement du sol ainsi que toutes les méthodes permettant d'intégrer tant de N à mes recherches. Merci pour les cours et tous les conseils fournis pour l'enseignement, grâce à cela, j'ai complètement changé d'avis sur cet aspect du métier de MCU qui me rebutait quand je suis arrivé au laboratoire.

Enfin merci à tous les deux pour m'avoir aidé à développer mon esprit critique, mon sens du compromis et de la négociation. A vos côtés, j'ai beaucoup appris, mûri et été bien préparé à toutes les difficultés et contraintes que représentent la recherche.

Grâce à vous, j'ai rencontré de nombreux chercheurs dans le cadre du projet VITAL qui m'ont apportés beaucoup. Tout d'abord merci à Catherine pour les nombreux échanges par mail, sa patience et son sens de l'interprétation de mon anglais. Merci à Richard, Michael S, Michael B, Ulrike et Salvador pour les échanges scientifiques constructifs et enrichissants. Un merci plus particuliers à Franck, Thomas pour les différentes échanges que l'on a eu sur les communautés microbiennes qui m'ont permis de ne plus avoir un point de vue essentiellement « plante-centrée » et pour votre aide sur mes deux campagnes de terrain en compagnie de Maxime, Amélie et Nadine.

Merci à Bello et Marie-Noëlle pour les échanges que nous avons eu sur les champignons et votre aide dans la dernière ligne droite qui m'a bien soulagée.

Merci à Emma, Servane et Philippe pour leur aide et leur accueil toujours chaleureux dans le labo EVA. C'est avec plaisir que je suis revenu vous voir soit pour faire une expérience supplémentaire avec vous, pour analyser mes échantillons ou encore pour passer des heures à scanner mes racines. J'en profite pour remercier Jérémy qui m'a courageusement accompagné dans le NORD pour y faire une expérience.

Je tiens aussi à remercier les premières personnes que j'ai rencontrées lorsque je suis arrivé à Grenoble et plus précisément à la station alpine du Lautaret. Merci à eux de m'avoir si bien accueilli même si je leur ai fait peur lors de mon premier séjour (moins d'une journée), et qui se sont inquiétés des capacités d'adaptation d'un fumeur normand arrivant en tee-shirt à 2000m

d'altitude. Merci notamment à Serge, Roland, Pascal, Christophe et Amandine pour leur bonne humeur quotidienne et les quelques soirées d'anthologies que nous avons partagées au col. Merci à Pascal et Johan pour leur aide très précieuse, un jour de neige en Novembre 2009 lors d'un échantillonnage de sol. Merci à vous tous pour les différentes choses que vous m'avez apprises, que ce soit en relation avec la botanique ou non. J'ai énormément apprécié l'ensemble des 6 mois au col.

Ces transhumances estivales se sont également bien passé grâce aux différents colocataires du chalet-labo qui ont animé mes soirées et empêché ma dépression au-dessus de mon évier. Merci à Maxime, Jonathan, Fabrice, Florian, Constance, Marie-Lise, Harold, Quentin, Rachel, Marjorie, Aloïs et Jessie. Bien qu'au cours de ces deux étés, j'ai un peu subi le dictat du végétarisme, je n'en garderais que de très bons souvenirs donc merci à vous tous.

Je tiens à remercier très fortement mes stagiaires, Edith, Iris, Natacha et Rémy sans qui je n'aurais pas pu faire autant d'expériences et de mesures au cours de ma thèse. Dommage qu'aucun d'entre eux n'aient apprécié à sa juste valeur, le plaisir de la récolte des racines...

Je remercie l'ensemble des membres du précieux café du matin, Stéphane, Sylvie, Mathieu, Fabrice, Guillaume, Alexia, Muriel, Rodolphe, Angélique, Jacky, Maud, Sophie P, Claire, Christophe, Fred, Sophie S et les autres personnes plus occasionnelles. Grâce à vous, j'ai commencé toutes mes journées dans la bonne humeur, j'espère que mon humour noir à trash vous manquera un peu...

Enfin, je ne vais pas oublier l'ensemble des différents occupants de la tanière de FYSE. Merci à Cécile, Hanna, Jonath, Katja, Marie-Lise, Fabrice, Pierre, Maud, Emilie et Coline. Merci de m'avoir supporté dans votre bureau, d'avoir subi mon humour et désolé pour ceux que j'ai « déformé » ou amplifié le décryptage de la moindre phrase prononcée !

Un merci tout particulier à Fabrice avec qui j'ai eu des échanges scientifiques et humains très enrichissants. J'ai passé de très bons

moments avec toi au labo ou au col. Faire des manips avec toi jusqu'à 2-3 h du mat' au Lautaret était plus un plaisir qu'une corvée. Merci à Mathieu pour son humour et sa bonne humeur quotidienne. Les journées et soirées en ta compagnie ont été très vivantes et me permettaient de relâcher la pression. Merci pour ton aide précieuse sur le terrain me permettant d'étudier des carottes magnifiques. Merci également à Guillaume pour son humour aussi noir et trash que le mien. Si nous ne réussissons pas dans la recherche, je pense que l'on essaiera de monter cet hôtel si particulier au bord d'un hôpital...

Merci aussi à l'ensemble de l'équipe de terrain EMABIO puis METABAR qui m'ont sorti du labo quand je n'avais plus de terrain en 2012 pour faire une campagne d'échantillonnage très sympathique à Valloire même si cela m'a coûté un genou...

Enfin merci à l'ensemble de ma famille et belle-famille qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de ma thèse. Merci surtout à ma compagne, Oriane qui m'a suivi jusqu'à Grenoble pour faire cette thèse et qui a supporté mes différents moments de stress, un autiste pendant les dernières semaines de rédaction. Merci pour ton soutien et tes encouragements, cela n'aurait probablement pas été possible sans toi.

AVANT PROPOS

Ces travaux ont été effectués dans le cadre d'un projet européen regroupant plusieurs équipes de recherche : allemande (HELM, Munich), anglaise (Université de Lancaster), autrichienne (UIBK, Innsbruck), espagnole (Université de Barcelone) et françaises (LEM, Lyon ; EVA, Caen ; LECA, Grenoble), le projet VITAL (Ecosystem serVice provision from coupled planT and microbiAL functional diversity in managed grasslands). Ce projet portait sur les services des écosystèmes dans un contexte de changements globaux.

Ce projet multidisciplinaire a été financé dans le cadre de l'EraNet-BiodivERsA et dirigé par Sandra Lavorel. Il avait pour objectif de produire un modèle conceptuel basé sur les relations entre la diversité fonctionnelle végétale et microbienne, et leurs impacts sur les services des écosystèmes dans les prairies de montagnes. Ces relations ont été étudiées sur trois sites en Europe fournissant un gradient d'intensité de pratiques agricoles représentatif des gestions typiques des régions montagneuses de l'Europe de l'Ouest : Alpes autrichiennes (Stubai Valley), françaises (Lautaret), une zone montagneuse du nord de l'Angleterre (Yorkshire Dales). A travers une approche socio-écologique, VITAL a cherché à : (1) identifier les principaux services des écosystèmes ; (2) identifier les indicateurs des mécanismes fins des relations plantes-microorganismes et de leurs réponses aux changements de gestion, (3) développer un modèle conceptuel des réponses en terme de diversité fonctionnelle végétale et microbienne à partir d'une étude en mésocosme, (4) valider le modèle *in situ* sur les trois sites, (5) projeter la fourniture de services des écosystèmes dans le futur selon différents scénarios, (6) identifier et répondre aux besoins des acteurs locaux concernés et des décideurs politiques. Les travaux de ma thèse ont porté sur les approches écologiques (points 2, 3 et 4) qui ont été menées sur les trois sites européens pour les points 3 et 4. Dans ce cadre, j'ai travaillé en étroite relation avec les différents partenaires du projet.

Table des matières

Résumé.....	i
Remerciements.....	iii
Avant-propos.....	vii
Chapitre 1 - Introduction.....	1
I. Composantes et interactions dans un écosystème terrestre.....	3
1. Le sol, base des écosystèmes terrestres.....	3
a. L'écologie des écosystèmes.....	3
b. Le sol, base des écosystèmes terrestres.....	4
2. Rôles des communautés végétales dans le fonctionnement des écosystèmes.....	7
a. Les traits fonctionnels végétaux comme outils de prédiction de la dynamique des communautés végétales.....	7
b. Les traits fonctionnels végétaux et le fonctionnement des écosystèmes.....	8
3. Les paramètres fonctionnels microbiens liés au cycle de l'azote et les relations plantes-microorganismes du sol.....	12
a. Les paramètres fonctionnels des communautés microbiennes.....	12
b. Les relations plantes-microorganismes du sol et l'acquisition des nutriments.....	14
c. Les relations plantes-microorganismes et le fonctionnement des écosystèmes.....	15
4. Conclusions.....	18
II. Les prairies subalpines du Col du Lautaret.....	20
1. Le site d'étude.....	20
2. Les changements d'utilisation des terres à l'origine de la spécificité des prairies.....	22
3. L'étage subalpin : un milieu contraignant soumis aux variations saisonnières.....	26
III. Objectifs et structure de la thèse.....	29
1. Objectifs.....	29
2. Structure de la thèse.....	31
Références.....	34
Chapitre 2 - Expérimentations & méthodes.....	43
Sites, sols et fertilisations.....	45
Les traits fonctionnels végétaux.....	55
Analyses physico-chimiques du sol.....	57
Analyses microbiennes.....	59
Références.....	62
Chapitre 3 - Stratégies de gestion des ressources par les plantes et traits fonctionnels végétaux –	
Relations avec les propriétés microbiennes du sol.....	65
Introduction.....	67

Article 1	69
Conclusion	95
Article annexe.....	99
Chapitre 4 - Contribution des traits fonctionnels végétaux aux processus d'un écosystème simplifié	131
Introduction	133
Article 2	135
Conclusion	175
Chapitre 5 - Les traits fonctionnels végétaux comme prédicteurs des propriétés écosystémiques -	
Importance du rôle des traits fonctionnels racinaires.	177
Introduction	179
Article 3	181
Article 4	205
Conclusion	237
Chapitre 6 - Etudes des variations saisonnières de l'absorption de l'azote inorganique	241
Introduction	243
Article 5	245
Article 6	281
Conclusion	307
Discussion générale	311
1. Les expérimentations emboîtées : des mécanismes fins des relations plantes- microorganismes aux interactions à l'échelle de l'écosystème	315
2. Les relations plantes-microorganismes	317
a. Les mécanismes fins	317
b. Les interactions plantes-microorganismes et les propriétés des écosystèmes	320
c. Confirmation des patrons in situ	323
d. Stratégies d'acquisition des nutriments et relations avec les communautés microbiennes	327
3. Pertinence de l'utilisation des traits fonctionnels végétaux	329
a. Apport des traits fonctionnels racinaires	330
b. Limites des traits fonctionnels racinaires.....	332
4. Limites de l'étude	334
5. Conclusions.....	336
a. Synthèse	336
b. Perspectives.....	337
Références	339

Chapitre 1

Introduction

Ce premier chapitre introduit le cadre conceptuel dans lequel ma thèse s'établit. La première partie présente le contexte et l'avancée des recherches en écologie des écosystèmes, et plus particulièrement dans les interactions entre les plantes et les microorganismes du sol en relation avec la disponibilité en azote (N) du milieu. La seconde partie détaille les objectifs et les hypothèses de mes travaux de recherches ainsi que le site d'étude et la logique dans le choix des dispositifs expérimentaux pour obtenir des réponses aux questions posées.

I. Composantes et interactions dans un écosystème terrestre

1. Le sol, base des écosystèmes terrestres

a. L'écologie des écosystèmes

Un écosystème regroupe l'ensemble des organismes de la faune et de la flore vivants au sein d'un milieu, ainsi que les différentes composantes abiotiques avec lesquelles ils interagissent (Chapin *et al.*, 2011). Chaque écosystème terrestre est caractérisé par les conditions abiotiques (climatiques, géologiques, édaphiques et hydrologiques), qui sont à l'origine de sa formation comme de son évolution. La combinaison de ces conditions, qui se décline en un gradient d'intensité plus ou moins important, entraîne la mise en place de contraintes abiotiques multiples et donc d'autant d'écosystèmes différents dans lesquels les organismes vivants se sont adaptés. Au sein de ces écosystèmes, les organismes vont interagir entre eux et avec le milieu, impliquant un réseau de flux de matières (eau et nutriments) et d'énergie (chaleur, CO₂) dépendants des conditions abiotiques (Sitch *et al.*, 2003). La compréhension de ces interactions est cruciale, notamment si l'on se place d'un point de vue anthropocentré. En effet, comme tous les autres êtres vivants, l'Homme utilise des ressources du milieu pour sa subsistance, mais aussi pour des intérêts économiques. Depuis plusieurs décennies, cette exploitation des ressources a fortement augmenté entraînant de nombreuses dégradations pour les écosystèmes (perte de biodiversité, pollution des eaux et des sols, etc...) (Vitousek *et al.*, 1997). C'est dans ce contexte qu'est apparue la notion de services écosystémiques, qui regroupent tous les bénéfices que l'Homme peut retirer d'un écosystème de par son fonctionnement (Millenium Ecosystem Assessment, 2005). Ce concept a été mis en avant afin de promouvoir la protection de l'environnement en mettant l'accent sur les coûts de

sa dégradation (Costanza *et al.*, 1997). L'approche écosystémique en écologie est un des outils permettant d'évaluer et de comprendre comment est assurée la fourniture de ces services par les écosystèmes, et dont l'un des objectifs est de permettre une meilleure gestion pour assurer un maintien des nombreuses ressources disponibles sur la planète. Cette approche est d'autant plus efficace qu'elle permet également de prendre en compte les effets des changements globaux (changements climatiques, changements d'utilisation des terres,...) (Riedo *et al.*, 1998 ; Sala *et al.*, 2000), sur les différentes composantes biotiques et abiotiques d'un écosystème et par conséquent, sur les nombreux services fournis par notre environnement.

Dans le cas des écosystèmes prairiaux et des relations plantes-microorganismes du sol qui font l'objet de cette thèse, il est donc nécessaire d'avoir une connaissance approfondie des communautés végétales et microbiennes, ainsi que du milieu où les interactions vont se dérouler, le sol. Dans cette partie, je vais donc exposer ce qu'il est nécessaire de savoir sur le sol et sur l'influence de ses paramètres sur les communautés végétales et microbiennes. Je détaillerai ensuite les connaissances actuelles sur les traits fonctionnels végétaux puis je terminerai avec les traits fonctionnels microbiens dans le cadre du cycle de l'N et des relations plantes- microorganismes.

b. Le sol, base des écosystèmes terrestres.

Le sol est un écotone dont la formation est le résultat de l'action de multiples facteurs abiotiques (climatique, géologique et hydrologique) et biotiques sur un pas de temps plus ou moins long. L'alliance de ces différents facteurs permet la formation de multiples types de sol dont les propriétés vont fortement influencer les conditions abiotiques auxquelles les espèces animales, végétales et microbiennes devront s'adapter pour s'y développer. Ces espèces, vont en retour influencer la formation du sol, soit lors de leur mort en apportant de la matière organique, soit par leurs activités biologiques ou par leur simple présence (cf. ombrage et humidité du sol). Ces facteurs abiotiques vont également déterminer la texture d'un sol, c'est-à-dire les proportions de sables, de limons et d'argiles qui déterminent la structure du sol. L'obtention d'une « bonne » structure de sol est reconnue comme un élément clé de la fertilité du sol car elle influence de nombreux paramètres physico-chimiques tels que la disponibilité en nutriments (NO_3^- , PO_4^{2-}) essentiels à la production de biomasse végétale et à l'activité microbienne, mais également en régulant les flux d'eau, de gaz, et le pH. L'eau du sol est d'une importance cruciale dans tous les écosystèmes puisqu'elle rend les écosystèmes habitables et est un des facteurs les plus importants de la distribution et de la croissance des

communautés végétales (Hawkins *et al.*, 2003) et microbiennes (Nesci *et al.*, 2004). Le pH du sol joue sur la disponibilité et l'absorption de certains nutriments pour les plantes tel que le phosphore (P) (VanOorschot *et al.*, 1997) ou l'N inorganique (NH_4^+ et NO_3^-) (Garnett & Smethurst, 1999), et est reconnu comme un facteur abiotique majeur ayant des effets directs ou indirects sur la structure et la diversité des communautés végétales et microbiennes (Roem et Berendse, 2000), impactant ainsi les interactions plantes-microorganismes (Eskelinen *et al.*, 2009). Ainsi en fonction de sa structure et de sa composition chimique, le sol va présenter des niveaux variables de fertilité et donc de disponibilités en nutriments, notamment l'N. Dans mes travaux de recherches, **la disponibilité de l'N est le facteur majeur du sol que j'ai étudié**, je vais donc présenter brièvement son cycle et son importance dans les interactions entre communautés végétales et microbiennes.

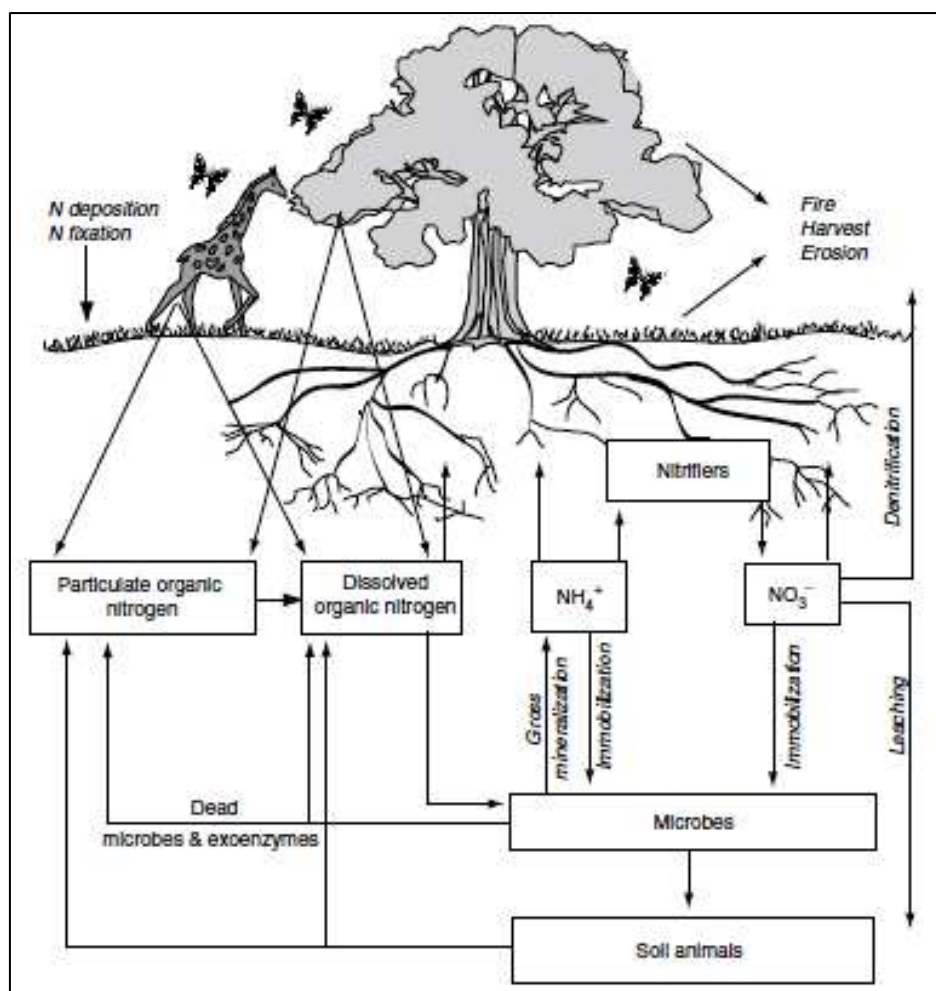


Figure 1 : Schéma simplifié du cycle de l'N dans un écosystème terrestre (Chapin *et al.*, 2011)

L'azote est un élément majeur constituant l'un des nutriments les plus limitant dans les écosystèmes terrestres (Kaye & Hart, 1997) pour la productivité primaire, et par conséquent pour les autres niveaux trophiques. Son cycle est complexe et met en jeu de nombreux processus de transformation effectués par les végétaux, les animaux et surtout les microorganismes du sol (Fig. 1). L'azote peut entrer dans les écosystèmes par déposition atmosphérique sèche (poussières) ou humide lors des précipitations pluvieuses ou neigeuses (Fenn *et al.*, 2003) (entre 5 et 60 kg d'N ha⁻¹ an⁻¹ dans le nord de l'Europe - Clément *et al.*, 2012), par fixation de N₂ atmosphérique réalisée par des microorganismes libres dans le sol (Wynn-Williams, 1993 ; Belnap *et al.*, 2003) ou par des bactéries symbiotiques associées aux racines des végétaux (Cleveland *et al.*, 1999; Vitousek *et al.*, 2002). Des entrées anthropiques liées à l'apport d'engrais minéral ou organiques par l'agriculture ou au dépôt de fèces par les animaux d'élevage existent également et l'enrichissement en N du milieu dépend souvent de l'intensité de l'exploitation des terres par l'Homme. Les sorties d'N de l'écosystème se font par lessivage des sols (perte de NO₃⁻ majoritairement ou de nitrites (NO₂⁻)), par dénitrification qui peut être abiotique (photolyse de nitrate) (Amoroso *et al.*, 2010) ou microbienne (Attard *et al.* 2011, Clément *et al.*, 2003), ainsi que par exportation de biomasse par herbivorie et par les activités agricoles (fauche et pâturage). Enfin dans l'intervalle, l'N va circuler dans la biosphère et subir diverses transformations par des processus microbiens (Fig. 1). Le cycle de l'azote est complexe puisque c'est un élément qui se retrouve intégré dans plusieurs formes de molécules plus ou moins simples, libres dans la solution du sol ou absorbées et transformées par une multitude d'organismes. Les différentes formes intermédiaires de l'N dans le sol commencent à être assez bien connues, **mais les rôles des différents microorganismes ainsi que leurs contributions (autres que sur les cycles biogéochimiques *stricto sensu*) au fonctionnement des écosystèmes et aux services qui en découlent sont encore peu connus**; les recherches dans ce domaine sont d'ailleurs en plein essor (cf paragraphe 3).

Le sol est donc une interface complexe des écosystèmes terrestres où de nombreux paramètres physico-chimiques interagissent et constituent un habitat auquel les microorganismes du sol et les communautés végétales devront s'adapter. Pour se développer sur ou dans ce milieu, les communautés végétales et microbiennes doivent être capables d'acquérir l'eau et les nutriments nécessaires à leur croissance et à leur reproduction. Ces communautés vont donc développer des réponses adaptées aux conditions édaphiques, et vont en retour affecter le sol. Les communautés végétales et microbiennes vont aussi interagir entre elles pour l'acquisition des ressources *via* des mécanismes de compétition ou de mutualisme

par exemple. Les réponses et les effets de ces organismes sur leurs environnements ont été largement étudiés par la communauté scientifique.

2. Rôles des communautés végétales dans le fonctionnement des écosystèmes

a. Les traits fonctionnels végétaux comme outils de prédiction de la dynamique des communautés végétales

Pour se développer dans un écosystème, une espèce végétale doit être capable de résister aux contraintes abiotiques de son habitat (humidité, température...), et d'y acquérir les ressources nécessaires à son développement. La disponibilité de ces différentes ressources varie dans le temps et l'espace, entraînant une compétition plus ou moins intense pour son acquisition entre les organismes. Ces différentes contraintes et les interactions entre les organismes qu'elles entraînent, constituent des filtres abiotiques et biotiques qui sélectionnent les espèces capables de persister dans une communauté à partir d'un pool disponible (Keddy, 1992 ; Diaz *et al.*, 1998). Les espèces ainsi sélectionnées vont partager une gamme de caractéristiques morphologiques, éco-physiologiques et génétiques appelées **traits fonctionnels** leur permettant de se développer au sein de cet écosystème (Lavorel *et al.*, 1997, Violle *et al.*, 2007). Ces traits sont aussi appelés **traits de réponse** et permettent de comprendre les réponses adaptatives d'un organisme face aux facteurs environnementaux (Violle *et al.*, 2007, Lavorel & Garnier, 2002). En retour, à travers ces traits, les individus influencent le fonctionnement des écosystèmes (Lavorel & Garnier, 2002) (Fig. 2). La gamme de traits présente dans une communauté végétale est donc le résultat à la fois de l'action de multiples filtres abiotiques et biotiques, et des réponses appropriées permettant de se développer au sein de ce milieu (Keddy, 1992).

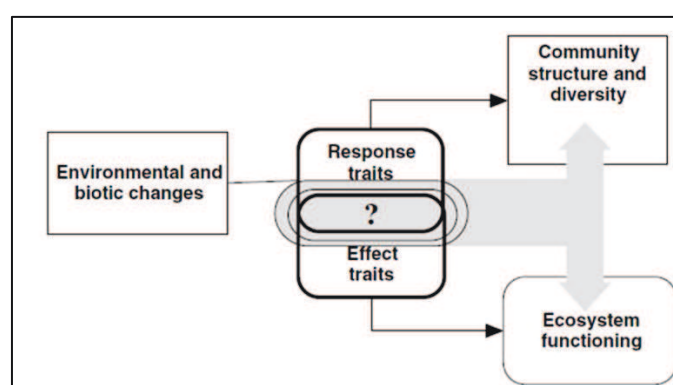


Figure 2 : Diagramme conceptuel présentant les traits fonctionnels comme centraux dans les réponses des écosystèmes aux changements globaux (tiré de Lavorel & Garnier, 2002).

Les études sur la fertilité du sol (pH, nutriments, eau) ont montré que la disponibilité en N induit des changements des traits d'espèces (Grime, 1977 ; Chapin, 1980 ; Tilman, 1985). Ces traits fonctionnels végétaux peuvent donc servir d'indicateurs de la disponibilité des nutriments pour les plantes. La diversité de ces traits dans une communauté végétale va refléter les différences entre les espèces et les individus en termes de besoins et de capacités d'acquisition de l'N, des formes d'N exploitées ou des parties du sol explorées pour acquérir leurs ressources. Mesurer cette diversité fonctionnelle, qui inclut la richesse et la composition fonctionnelle, permet d'étudier le fonctionnement et les processus de l'écosystème (Diaz & Cabido, 2001 ; Kirwan *et al.*, 2009). Deux descripteurs de la composition fonctionnelle sont fréquemment utilisés dans les études récentes sur la structuration fonctionnelle des communautés, et sur ses relations avec le fonctionnement des écosystèmes. Le premier part du principe que les traits fonctionnels des espèces dominantes d'une communauté ont plus d'influence sur le fonctionnement des écosystèmes (p. ex. sur la productivité primaire) (Grime, 1998) en se référant à la **moyenne des valeurs de traits de la communauté** où chaque espèce a un poids égal à son abondance relative dans la communauté végétale (Garnier *et al.*, 2004 ; Vile *et al.*, 2006). Le second se base sur la distribution des différents traits fonctionnels au sein de la communauté végétale, c'est la **divergence fonctionnelle** (Mason *et al.*, 2003) qui propose que la dissimilarité des traits entre espèces au sein d'une même communauté correspond à différents patrons d'utilisation des ressources (Petchey & Gaston, 2006). La littérature sur les traits fonctionnels végétaux est abondante et les études concernant les traits caractéristiques des stratégies d'acquisition des nutriments et leurs effets sur le fonctionnement des écosystèmes sont nombreuses et ont permis de faire de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes du fonctionnement des écosystèmes.

b. Les traits fonctionnels végétaux et le fonctionnement des écosystèmes

Dans les communautés végétales des écosystèmes prairiaux, il a été démontré depuis déjà quelques décennies que les traits fonctionnels végétaux permettaient de différencier les stratégies d'acquisition des nutriments et le cycle de vie des différentes espèces (Grime, 1977 ; Tilman, 1985 ; Westoby, 1998). Deux grands types de stratégies ont été mises en évidence avec d'une part, les espèces dites **exploitrices** dominantes dans les milieux fertiles, avec de fortes capacités d'acquisition des ressources et un taux de croissance élevé (Poorter & Remkes, 1990 ; Wright *et al.*, 2004). A l'opposé, les espèces dites **conservatrices**, dominantes dans les milieux pauvres en nutriments, ont des capacités d'acquisition des ressources plus faibles, une croissance lente (Craine *et al.*, 2002 ; Wright *et al.*, 2004),

conjuguées à des mécanismes de conservation et de recyclage internes des nutriments (Aerts, 1996) (Fig. 3). Les stratégies employées par ces deux « types » d'espèces se reflètent dans leurs caractéristiques morphologiques et donc dans leurs traits fonctionnels. Ainsi, les espèces exploitatrices sont le plus souvent caractérisées par une forte surface spécifique foliaire (SLA : Specific Leaf Area), une concentration élevée en N foliaire (LNC : Leaf Nitrogen Content) (Lavorel & Garnier 2002), et une forte concentration en N dans les racines (RNC : Root Nitrogen Content) (Roumet *et al.*, 2006). A l'opposé, les espèces conservatrices présentent une forte teneur en matière sèche foliaire (LDMC: Leaf Dry Matter Content), une forte concentration en C par rapport à celle de l'N dans les feuilles (C:N foliaire), une faible concentration en N racinaire et une faible longueur spécifique racinaire (SRL : Specific Root Length) (Eissenstat, 2000). L'utilisation de ces traits fonctionnels donne une estimation de la disponibilité de l'N sur la période de croissance des plantes et de leurs capacités d'acquisition des nutriments du milieu sans nécessairement connaître précisément les espèces et leur biologie (même si cela nécessite d'être capable de reconnaître les individus de chaque espèce) puisqu'elle se base exclusivement sur des mesures morphologiques d'individus de la même espèce (voir détails dans le chapitre 2). Bien que moins coûteuses, les analyses de la concentration en nutriments dans le sol donnent la quantité totale de nutriments, à un temps donné et pour une profondeur de sol fixée, et non la quantité réellement assimilable par les plantes. Des méthodes alternatives et intégratives comme l'insertion de résines échangeuses d'ions dans le sol permettent de mieux estimer cette biodisponibilité des éléments dans le temps et l'espace mais elles comportent malgré cela certains inconvénients (détails dans le chapitre 2).

L'intérêt d'utiliser les traits fonctionnels en écologie des écosystèmes ne se limite pas à cet aspect descriptif puisqu'il permet également d'étudier le fonctionnement des écosystèmes tel que les réponses des individus aux interactions biotiques végétales (Gross *et al.*, 2007), ou les effets des communautés végétales sur les écosystèmes (Diaz *et al.*, 2007 ; Quétier *et al.*, 2007 ; Gross *et al.*, 2009). Les interactions biotiques entre les individus d'une même communauté végétale peuvent être négatives (compétition) ou positives (facilitation), mais influencent dans les deux cas la structure de la communauté (Klanderud & Totland, 2005) et jouent un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes puisque la composition de la communauté (identité des groupes fonctionnels) va avoir de forts effets sur les propriétés des écosystèmes (Hooper & Vitousek, 1997).

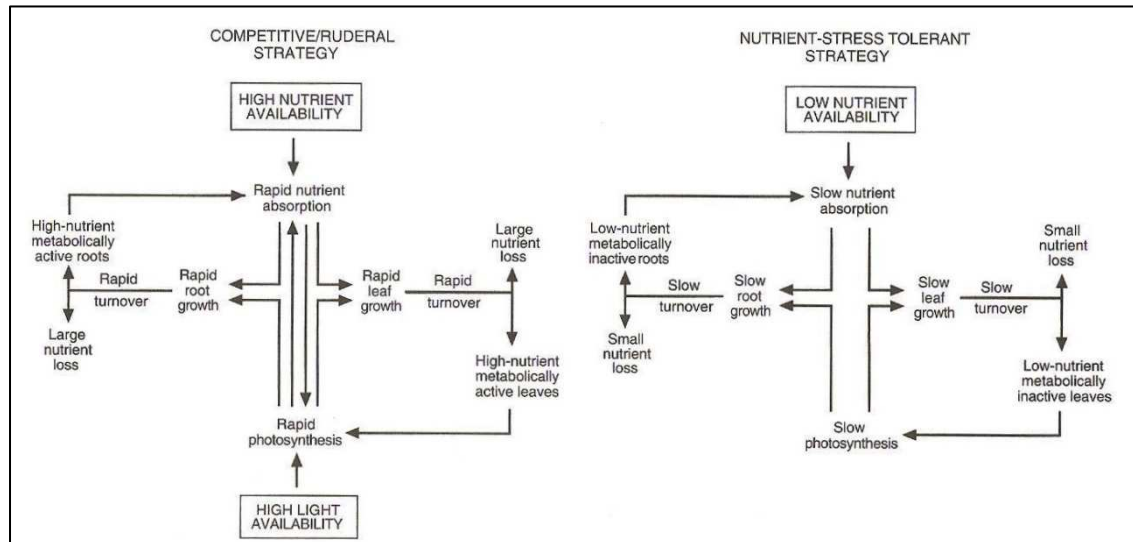


Figure 3. Représentation schématique des différences physiologiques majeures entre les espèces exploitatrices (competitive-ruderal strategy) et conservatrices (nutrient-stress tolerant strategy). D'après Craine (2009), adapté de Chapin (1980).

Dans le cas des interactions biotiques strictes, les traits fonctionnels permettent d'identifier les espèces les plus compétitives pour l'acquisition de la lumière et des nutriments (Fig. 3). Ainsi en prairie, une espèce avec une hauteur végétative ou une SLA élevée est plus compétitive pour l'acquisition de la lumière puisque cela lui permet d'être plus haute dans la canopée et/ou de développer une surface foliaire supérieure, pour capter plus de lumière tout en faisant de l'ombre à ses compétiteurs (Fahey *et al.*, 1998). En ce qui concerne l'acquisition des nutriments, la SLA et les concentrations foliaires et racinaires en N sont les traits les plus couramment utilisés pour déterminer les vitesses d'assimilations des nutriments des espèces (Lavorel & Garnier, 2002 ; Craine *et al.*, 2002). Cependant, le taux de croissance (RGR : relative growth rate) des espèces doit également être pris en compte pour estimer ces capacités d'assimilations puisqu'une espèce à fort LNC peut-être soit exploitatrice avec une forte vitesse d'assimilation des nutriments couplée à un fort RGR, soit conservatrice avec une faible vitesse d'assimilation couplée à un faible RGR (Quétier *et al.*, 2007 ; Craine, 2009). Les traits racinaires liés à la longueur totale ou à la SRL sont dans ce cas de meilleurs indicateurs (bien que difficile à mesurer) puisqu'une espèce développant un long système racinaire pourra explorer un plus grand volume de sol pour acquérir de l'eau et des nutriments (Robinson *et al.*, 1999). D'autres traits fonctionnels sont également utilisés comme les capacités d'absorption des nutriments (Maire *et al.*, 2009) ou encore l'efficacité des plantes à utiliser ces nutriments pour produire de la biomasse (Van Ruijve & Berendse, 2005 ; Gross *et al.*, 2007). De nombreux travaux sur les interactions biotiques entre individus des

communautés végétales ont utilisé les traits fonctionnels, voir Garnier & Navas (2012) pour plus d'informations.

Les processus ou fonctions des écosystèmes, et les services qui en découlent, peuvent également être quantifiés par l'étude des traits fonctionnels. De nombreuses études se sont intéressées aux processus écosystémiques ayant un intérêt pour l'Homme comme la quantité et la qualité de la biomasse aérienne (Garnier *et al.*, 2007 ; Schumacher & Roscher, 2009). La productivité primaire et la digestibilité de la biomasse aérienne végétale ont souvent été reliées à des traits fonctionnels végétaux et on sait aujourd'hui que ces processus dépendent plus de la composition fonctionnelle que de la composition spécifique des communautés (Diaz *et al.*, 2007). Ainsi, certains traits présentés précédemment, comme les indicateurs de fertilité (SLA, hauteur végétative), sont également de bons marqueurs de la productivité primaire aérienne (Poorter & De Jong, 1999 ; Schumacher & Roscher, 2009 ; Lavorel *et al.*, 2011), de même avec la LDMC et le LNC pour la digestibilité (Pontes *et al.*, 2007 ; Ansquer *et al.*, 2009). Bien que plus difficile à échantillonner dans un sol, la productivité souterraine est un processus écosystémique important si l'on s'intéresse au cycle du carbone ou à l'érosion des sols (Dijkstra *et al.*, 2006 ; Pohl *et al.*, 2011). La concentration en N des racines (Craine, 2009) et la SRL (Craine *et al.*, 2002) sont les traits fonctionnels permettant la meilleure estimation de la biomasse souterraine végétale. **Cependant, pour déterminer avec précision ces processus (ou propriétés) de l'écosystème liés aux communautés végétales, les paramètres physico-chimiques de l'habitat et notamment du sol doivent être pris en compte pour améliorer les modèles.** Par exemple, la productivité aérienne est au premier ordre déterminée par la disponibilité en N dans le sol (Elberse & Berendse, 1993 ; Bonanomi *et al.*, 2006), puisqu'une augmentation de l'N dans les feuilles favorise la photosynthèse et donc la production de biomasse (Craine, 2009). La même logique se répète pour la production de biomasse racinaire qui est largement influencée par la disponibilité en nutriments et en eau. Ainsi, les plantes vont accroître leur exploration du sol en augmentant la prospection racinaire lorsque la disponibilité en nutriment est faible (Robinson *et al.*, 1999 ; Maire *et al.*, 2009), ou répartie de manière hétérogène dans le sol (Hodge *et al.*, 2000). D'autres part, l'eau dans le sol participe au transport et à la diffusion des éléments nutritifs dans le sol (Brooks *et al.*, 1998), et une quantité d'eau suffisamment élevée dans le sol augmente la disponibilité des nutriments (Bardgett *et al.*, 2007) ; même si d'autres processus tels que la dénitrification peuvent altérer cette disponibilité (Attard *et al.*, 2011). De nombreux autres processus écosystémiques (détaillés ci-dessous) sont influencés par les traits fonctionnels végétaux, et par leurs interactions avec des traits microbiens (en plus des propriétés du sol).

3. Les paramètres fonctionnels microbiens liés au cycle de l'azote et les relations plantes- microorganismes du sol:

a. Les paramètres fonctionnels des communautés microbiennes :

Les traits fonctionnels des communautés microbiennes du sol ne peuvent pas être mesurés à l'échelle de l'individu comme chez les plantes mais directement à l'échelle de la communauté. C'est pourquoi, on préfère les nommer propriétés ou paramètres fonctionnels pour éviter tout abus de langage et bien différencier le principe de trait mesuré sur un individu puis moyenné à l'échelle de la communauté (Violle *et al.*, 2007).

Ces paramètres fonctionnels sont des critères de la composition de la communauté ou des activités enzymatiques liées aux cycles biogéochimiques. Les paramètres fonctionnels microbiens présentés ici seront essentiellement liés au cycle de l'N. L'un des paramètres prometteurs et faciles à mesurer, est la mesure de la distribution et de l'abondance des PLFA (phospholipid fatty acid : acides gras phospholipidique Bardgett *et al.*, 1996 ; cf chapitre 2). Ce paramètre permet d'avoir une estimation de la composition, de la biomasse, et de l'identité fonctionnelle et taxonomique de la communauté microbienne d'un sol (Bardgett *et al.*, 2001). Il reste un indicateur assez grossier puisqu'il ne permet pas une identification précise des communautés microbiennes du sol mais seulement de l'abondance de grands groupes en fonction de celle des PLFA qui leurs sont associés. Plusieurs PLFA correspondent à des bactéries et permettent de déterminer l'abondance de différents groupes tels que les Gram-négative ou Gram-positive, alors qu'un seul PLFA regroupe tous les champignons. Ces PLFA permettent ainsi de calculer l'abondance relative des champignons et des bactéries du sol (rapport F :B): un rapport F :B élevé signifie que la communauté microbienne est dominée par les champignons.

D'autres paramètres fonctionnels permettent d'obtenir des informations plus ciblées sur la composition des communautés microbiennes. Dans le cadre du cycle de l'N, il est possible de déterminer la quantité de certains gènes marqueurs de l'abondance de communautés microbiennes impliquées dans les étapes clés de transformation de l'N. Ces mesures peuvent se réaliser sur les gènes de communautés réalisant l'oxydation du NH_4^+ en NO_2^- (ammonium oxidizing archaea - AOA ; ammonium oxidizing bacteria - AOB), oxydant le NO_2^- en NO_3^- (*Nitrospira* et *Nitrobacter*) ou réalisant la dénitrification (gènes de la nitrite réductase (*nirK* et *nirS*)). Enfin, couplées à l'abondance de ces gènes, des activités enzymatiques et leurs paramètres cinétiques peuvent être mesurées telles que la nitrification (NEA) (Koper *et al.*, 2010 ; Dassonville *et al.*, 2011) et la dénitrification (DEA) potentielles

(Attard *et al.*, 2011). **Les études qui utilisent ces paramètres pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes sont encore peu nombreuses, mais elles permettent généralement de confirmer et de préciser les facteurs abiotiques impactant les communautés microbiennes.** Ainsi, les paramètres physico-chimiques du sol influencent la distribution, la composition et les activités microbiennes. Le pH du sol est l'un des paramètres majeurs impactant la composition des communautés microbiennes du sol (Fierer & Jackson, 2006 ; Eskelinen *et al.*, 2009), ainsi que les activités microbiennes (Laughlin *et al.*, 2011). Par exemple, un pH inférieur à 4.5 va limiter les communautés nitrifiantes du fait d'une toxicité à l'aluminium (plus soluble à pH acide) alors qu'un pH compris entre 6 et 7 est considéré comme optimal (Haynes, 1986). La disponibilité en eau influence aussi les activités et l'abondance des gènes de nitrification et de dénitrification (Attard *et al.*, 2010 ; Attard *et al.*, 2011). Logiquement, puisqu'ils constituent les substrats ou les produits de ces activités enzymatiques, la disponibilité en NH_4^+ et NO_3^- influencent la nitrification (Patra *et al.*, 2006 ; Leininger *et al.*, 2006 ; Le Roux *et al.*, 2008) et la dénitrification (Patra *et al.*, 2006 ; Henry *et al.*, 2008). De même, la composition des communautés oxydant l'ammonium (Le Roux *et al.*, 2008 ; Verhamme *et al.*, 2011) ou le nitrite (Attard *et al.*, 2010) ainsi que celle des communautés dénitrifiantes (Bremer *et al.*, 2007 ; Bannert *et al.*, 2011) sont affectées par la disponibilité en N du sol. Enfin, la disponibilité en C du sol qui constitue le substrat énergétique des communautés microbiennes hétérotrophes (cas des dénitrifiants), influence la composition des communautés fongiques et bactériennes (Griffiths *et al.*, 1999 ; De Vries *et al.*, 2012) ainsi que les activités enzymatiques (Aulakh *et al.*, 2000 ; Henry *et al.*, 2008).

Ces études ont, dans leur grande majorité, seulement analysées les effets des paramètres abiotiques du sol sur les paramètres fonctionnels microbiens, qui ont en retour des effets sur les propriétés du sol (nutriments, eau et indirectement le pH). **Ces paramètres fonctionnels microbiens ont un rôle important dans les cycles biogéochimiques et peuvent donc avoir un impact direct ou indirect sur les communautés végétales.** En effet, l'action de ces communautés microbiennes rend les nutriments disponibles aux plantes par la dégradation de la matière organique du sol ou par sa transformation en molécules assimilables par les végétaux.

A l'inverse, les microorganismes du sol peuvent séquestrer ces nutriments pour leurs propres besoins ou être à l'origine de pertes d'N comme c'est le cas pour la dénitrification. Par conséquent, les plantes et les microorganismes vont développer des interactions, mutualistes ou symbiotiques pour améliorer la disponibilité en nutriments, ou à l'inverse compétitives pour l'acquisition des ressources (Wardle *et al.*, 2004).

b. Les relations plantes-microorganismes du sol et l'acquisition des nutriments:

Dans un premier temps, la plupart des études sur les relations plantes-microorganismes du sol ont porté sur la compétition pour l'N (Kaye & Hart, 1997 ; Lipson & Nasholm, 2001 ; Dunn *et al.*, 2006 ; Harrison *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2008). Il en ressort que les microorganismes absorbent les nombreuses formes d'N présentes dans le sol (NO_3^- , NH_4^+ , acides aminés et peptides) alors que les plantes ont une préférence pour l'N inorganique plus facilement assimilable (Harrison *et al.*, 2007), même si elles ont les capacités d'absorber de petits acides aminés comme la glycine (Lipson *et al.*, 1999) en quantités équivalentes, voire supérieures à l'N inorganique dans certains milieux alpins (Miller & Bowman, 2003). Ces aspects de compétition pour les nutriments constituent les interactions les plus directes entre plantes et microorganismes. En effet, de fortes relations positives et négatives existent à travers des mécanismes de facilitation, de symbiose et de parasitisme. L'un des mécanismes de facilitation concerne la disponibilité des nutriments puisque certaines bactéries et cyanobactéries libres du sol fixent le N_2 atmosphérique (Paul & Clark, 1996) et fournissent ainsi une quantité d'N disponible supplémentaire pour les plantes. Des associations symbiotiques se développent avec les bactéries fixatrices de N_2 (*Rhizobium*, *Frankia*) permettant à certaines plantes (Fabacées) de se pourvoir en cet élément. La contribution de ces bactéries fixatrices pourrait s'élever à plus de 20% de l'N acquit annuellement par la végétation lorsque les Fabacées sont dominantes dans les écosystèmes (Cleveland *et al.*, 1999 ; van der Heijden *et al.*, 2006). De même, certaines bactéries de la rhizosphère peuvent stimuler la croissance des plantes *via* la synthèse d'hormones végétales ou par inhibition de la croissance de pathogènes (Sturz & Christie, 2003). Enfin, l'amélioration de l'acquisition des nutriments pour les plantes peut se faire grâce à la mise en place de symbioses avec des champignons mycorhiziens (endo- et ectomycorhizes, mycorhizes arbusculaires) leur permettant un accès à des ressources moins disponibles tel que le P (van der Heijden *et al.*, 1998). La présence de ces mycorhizes améliore également la résistance des plantes aux maladies et à la sécheresse grâce à une meilleure prospection du sol pour l'acquisition de l'eau (Wardle *et al.*, 2004). A l'opposé de ces relations positives, les microorganismes pathogènes limitent la productivité végétale (Klironomos, 2002) et influencent la structure d'une communauté et le fonctionnement de l'écosystème (Bever, 2003). **Cependant, ces études se sont clairement concentrées sur l'acquisition des nutriments, notamment pour les plantes, et la compréhension du fonctionnement de l'écosystème s'est donc souvent réduit à la productivité primaire de l'écosystème.**

c. Les relations plantes-microorganismes et le fonctionnement des écosystèmes.

De nombreuses études sur les relations plantes-microorganismes ont démontré que les plantes ont des effets clairs sur la structure et les fonctions des communautés microbiennes. Au niveau de la rhizosphère, ces effets sont principalement dus aux composés exsudés par les racines (Griffiths *et al.*, 1999). Au niveau du sol non rhizosphérique, ils sont liés aux dépôts de litière aérienne et racinaire qui seront dégradés par les communautés microbiennes (Wardle, 1992) (Fig. 4).

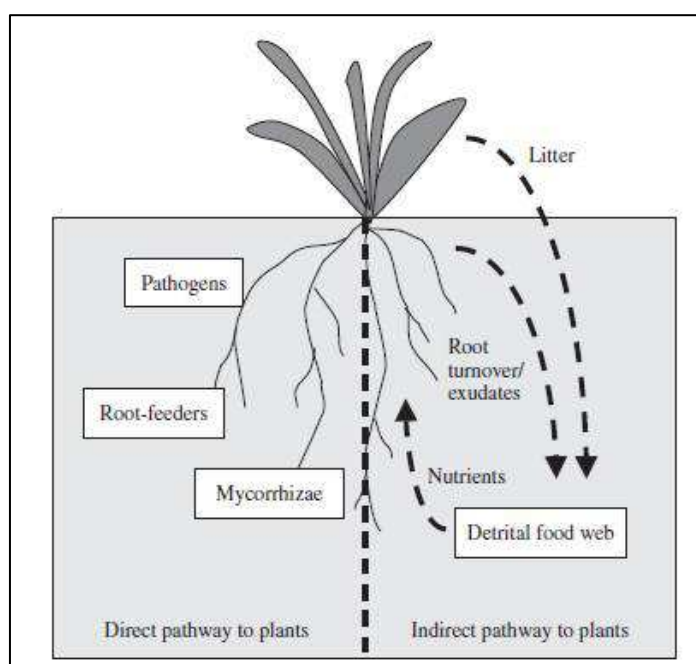


Figure 4. Schéma représentant les principales présentées interactions entre les plantes et les microorganismes (d'après Bardgett, 2005).

Ces dépôts de litières végétales sont l'un des facteurs majeurs du cycle des nutriments puisque les bactéries libres du sol vont produire, par transformation de cette matière organique, différentes sources de nutriments disponibles pour les communautés végétales et microbiennes. Les teneurs en N, lignine ou cellulose de cette litière sont reconnus comme étant des marqueurs de sa qualité (Wardle, 1992). La quantité mais surtout la qualité de la litière arrivée au sol vont avoir des impacts sur sa vitesse de décomposition et sa minéralisation (Wedin & Tilman, 1990). Les espèces qui produisent une litière riche en N et facilement dégradable favorisent un cycle des nutriments rapide contrairement aux espèces dont la litière est pauvre en nutriments et contient des composés difficilement dégradables comme la lignine (Aerts, 1999). En plus d'influencer la transformation de l'N en conditionnant la nature de la source de carbone pour les microorganismes (Falcão Salles *et*

al., 2012), cette qualité de la litière peut impacter l'abondance des communautés microbiennes en fonction de leurs capacités à utiliser ce substrat (Wardle, 1992). Une matière organique riche en phénols et pauvre en N est associée à une forte proportion de champignons dans les communautés microbiennes, alors que les bactéries sont plus abondantes lorsque la matière organique est pauvre en phénols et riche en azote (Eskelinen *et al.*, 2009). Le trait de la qualité de la litière le plus couramment utilisé (car facile à mesurer) est le rapport C sur N : une litière avec un faible C : N est décomposée généralement plus rapidement qu'une litière avec un rapport élevé (De Deyn *et al.*, 2008). De même, un rapport lignine : N élevé indique qu'elle sera moins rapidement décomposée (Scott & Binkley, 1997), mais ce trait, bien que plus précis, est moins utilisé car plus coûteux. Par conséquent de la qualité de leur litière, les communautés végétales vont influencer la composition et l'activité des communautés microbiennes du sol (ainsi que celle des autres organismes décomposeurs du sol). Cette influence sera dépendante de la gamme des traits de la litière produite par la communauté végétale: plus cette gamme sera large et plus les différences de quantité et de qualité de litière seront importantes et permettront un apport varié de ressources dans le sol (Bardgett & Wardle, 2003).

L'apport de C dans le sol est le second mécanisme par lequel les plantes peuvent impacter la composition des communautés microbiennes, le cycle des nutriments, et donc la croissance des plantes elles-mêmes (Grayston *et al.*, 1998 ; Kuzyakov, 2006; Bardgett *et al.*, 2005). Cet apport de C, des racines vers le sol, peut se faire *via* la mort des racines et leur turnover ou par exsudation de composés facilement dégradables. L'exsudation consiste en un relargage de carbohydrates, d'acides carboxyliques et d'acides aminés par les plantes, par exemple pour faciliter la pénétration des racines dans le sol, et est connu pour être un processus rapide puisque le C peut être exsudé de quelques minutes à quelques heures après sa fixation par photosynthèse (Hogberg *et al.*, 2001). Il a été estimé que 5 à 40% du C fixé pendant la photosynthèse peut ainsi être excrété dans le sol (Lynch & Whipps, 1990; Meharg, 1994), dont 1 à 10% sous forme de sucres simples (Paterson, 2003; Jones *et al.*, 2004). La quantité (Griffiths *et al.*, 1999) et la qualité (Grayston *et al.*, 1998 , De Deyn *et al.*, 2008) des composés exsudés dans le sol varient selon les espèces de plantes, et selon les facteurs biotiques et abiotiques (pH) qui influencent le développement des racines (Dakora & Phillips, 2002). En offrant une source de C, ces exsudats et les autres rhizodépôts (cellules mortes de la coiffe ou sécrétion de mucilage) vont modifier la composition des communautés microbiennes, et ainsi indirectement le cycle des nutriments (Van der kift *et al.*, 2001; Kuzyakov, 2006 ; Henry *et al.*, 2008), en stimulant les activités microbiennes (Merbach *et al.*,

1999; Paterson, 2003; Jones *et al.*, 2004) (Fig. 5). Il a été montré que cette exsudation de C possède un rôle d'amorce de la dégradation de la matière organique récalcitrante du sol (Kuziyakov *et al.*, 2006). De même que pour la litière, le rapport C : N d'un exsudat peut être relié à sa vitesse d'assimilation par la communauté microbienne (Bremer *et al.*, 2007, Henry *et al.*, 2008). **Par conséquent, les communautés végétales peuvent influencer le cycle des nutriments à leurs avantages en stimulant la minéralisation de l'N qui deviendra rapidement disponible pour les plantes du fait d'un recyclage rapide des microorganismes du sol (par rapport aux racines) (Schmidt *et al.*, 2007).**

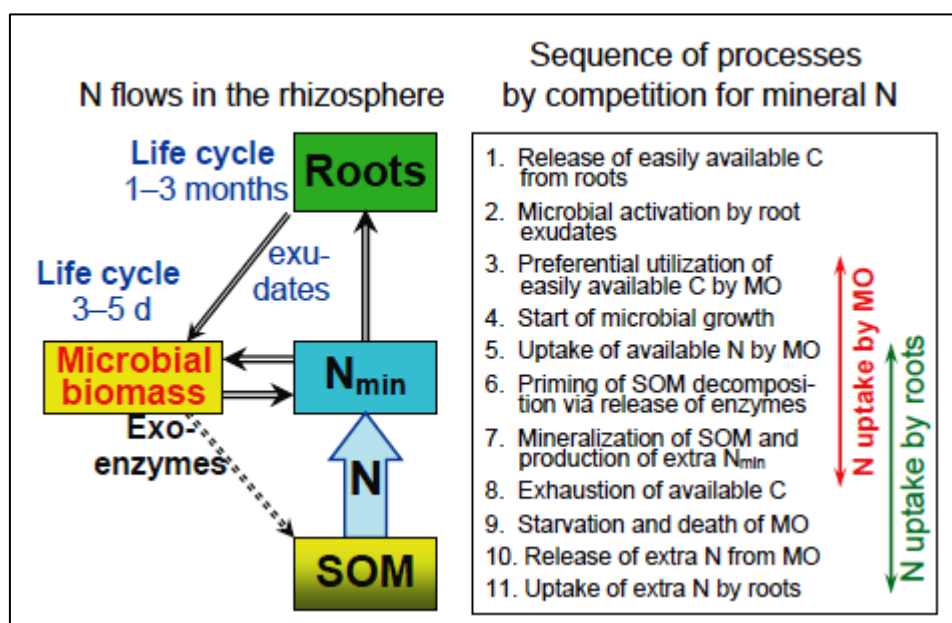


Figure 5. Représentation schématique de l'effet de exsudats sur les activités microbiennes du sol stimulant la dégradation de la matière organique et le cycle de l'N. Légende : MO : Microorganisme ; SOM Matière Organique du Sol ; Nmin : Minéralisation de l'azote. D'après Kuziyakov & Xu (2013).

A travers notamment les rapports C : N des exsudats et de la litière aérienne ou racinaire, les plantes influencent la minéralisation de la matière organique et donc la disponibilité des nutriments dans l'écosystème. Ainsi, bien que les propriétés abiotiques du sol restent le déterminant principal de la composition des communautés végétales et microbiennes, certaines propriétés du sol et des communautés microbiennes peuvent à leur tour être pilotées par les effets des végétaux à long terme (Kowalchuk *et al.*, 2002) à travers la quantité / qualité de leurs litières et de la rhizodéposition (Jones *et al.*, 2004).

4. Conclusions.

De nombreuses études ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes d'interactions entre les paramètres abiotiques du sol, les communautés microbiennes et les communautés végétales. Cependant les récentes connaissances obtenues restent difficiles à généraliser puisque **la majorité des études se sont concentrées sur une seule espèce ou cultivar végétal, et non sur des mesures *in situ* dans des communautés végétales complexes / diverses avec la prise en compte de leurs cortèges de traits fonctionnels.** Seules quelques études récentes ont examiné les effets des traits fonctionnels végétaux sur les microorganismes du sol, en se concentrant sur les traits foliaires (Laughlin *et al.*, 2011; De Vries *et al.*, 2012), ou sur les traits racinaires (Porazinska *et al.*, 2003; Valé *et al.*, 2005; Pohl *et al.*, 2011), mais rarement sur les deux à la fois. Deux études ont examiné simultanément les effets des traits de plantes aériens et racinaires sur les paramètres fonctionnels microbiens (Birouste *et al.*, 2012, Orwin *et al.*, 2010). Bien que cette étude n'ait pas directement mesuré de paramètres microbiens, Birouste *et al.* (2012) ont analysé la décomposabilité et les traits des racines en conditions contrôlées, et ont montré, que, comme pour les traits foliaires, la décomposabilité des racines est fortement liée aux caractéristiques chimiques (contenu en N et en C) plutôt qu'à leurs morphologies (diamètre). Orwin *et al.* (2010) ont rapporté qu'indépendamment des traits de plantes, la biomasse des racines, qui n'est pas un trait au sens strict, et le contenu en N et en C des racines ont de fortes relations avec la structure de la communauté microbienne *via* un effet sur le rapport entre champignons et bactéries du sol (PLFA F : B ratio). **L'intérêt de cette étude est que les auteurs ont également montré que les traits racinaires n'étaient pas fortement reliés aux traits foliaires, soulignant à la fois la complémentarité et la dichotomie des effets des traits végétaux aériens et souterrains sur le fonctionnement de l'écosystème, et donc l'importance de prendre en compte ces deux types de traits dans les analyses de données.** Enfin, ces études ont été réalisées sur des monocultures ou sur des communautés végétales simplifiées (Wardle *et al.*, 1998, Orwin *et al.*, 2010, Harrison & Bardgett, 2010), très peu d'études ont essayé de lier les traits végétaux et microbiens au champ (Laughlin *et al.* 2011; De Vries *et al.* 2012). **C'est à partir de ce constat d'un manque d'études sur les traits végétaux dans leur ensemble (aériens et racinaires) et de leurs liens avec les paramètres fonctionnels microbiens que mes recherches ont été construites.** Ces travaux ont été menés le long d'un gradient d'échelle, en complexifiant les systèmes d'études en passant du microcosme à l'étude au champ. Pour tenir compte des paramètres abiotiques et des activités humaines, plus de la moitié de mes

expérimentations ont été réalisées au Col du Lautaret où les prairies présentent des caractéristiques favorables pour ces recherches. Les résultats ont été comparés et intégrés à ceux d'expérimentations similaires réalisées sur deux autres sites européens dans le cadre du projet européen VITAL (Ecosystem serVIce provision from coupled planT and microbiAL functional diversity in managed grasslands - Era-Net, Biodiversa). Le site d'étude, mes questions et mes hypothèses de recherche ainsi que les détails des expérimentations sont présentés dans la partie suivante.

II. Les prairies subalpines du Col du Lautaret.

1. Le site d'étude

Les prairies sur lesquelles les expérimentations au champ ont été réalisées se situent dans la vallée de la Romanche entre le village de Villar d'Arène (1650m) et le Col du Lautaret (2055m) dans les Alpes françaises (45°02'N, 6°20' E). Ces prairies sont soumises à un climat subalpin avec une influence continentale, les températures moyennes sont comprises entre -7°C en février et +16°C en juillet (Quétier, 2006 ; Bakker *et al.*, 2008). La région est donc soumise à de fortes amplitudes thermiques avec deux saisons très contrastées, un hiver prolongé, froid et humide avec un couvert neigeux pouvant atteindre les 3 m d'épaisseur alors que l'été est court, relativement chaud et très sec. Cette zone étant située entre les Alpes internes et externes, cette vallée est protégée des précipitations qui sont donc relativement faibles et de l'ordre de 960-mm de pluie par an dont seulement 18% en été (Quétier, 2006). La période de végétation est courte puisque la saison de croissance débute à la fonte des neiges fin avril-début mai et continue jusqu'à fin septembre (Robson *et al.*, 2010). Le haut de pente est constitué d'un sol peu profond sur un substrat homogène de schistes argileux. Les bas de pentes sont composés de dépôts glaciaires comportant quelques éléments de schistes calcaires (Bakker *et al.*, 2008). Tandis que l'ubac de cette vallée est dominé par une forêt de mélèze, l'adret est composé de prairies ne représentant pas la végétation climacique de forêt de *Pinus cembra* (Ozenda, 1985). La mise en place de prairies à cette altitude est le fait d'une activité anthropique progressive du Moyen-Age jusqu'au milieu des années 1950, date à laquelle l'intensification de l'agriculture de plaine a entraîné un abandon de certaines pratiques agricoles de montagne (Girel *et al.*, 2010), induisant ainsi différents niveaux de perturbation sur cet écosystème. La conjonction de ces facteurs climatiques et anthropiques a permis le développement de communautés végétales particulières qui font des prairies subalpines, un des écosystèmes présentant la plus grande diversité d'espèces en Europe (Quétier, 2006 ; Quétier *et al.*, 2007). En effet dans ces prairies, les pratiques agricoles telles que la fauche ont favorisé une diversité importante à cette altitude (Quétier *et al.*, 2007), et différents types de communautés se sont développées selon l'intensité et le type de pratiques agricoles actuelles ou passées. Les prairies de Villar d'Arène possèdent une diversité fonctionnelle végétale qui varie en fonction de leur usage passé qui détermine la topographie actuelle (terrasse ou pente)

et de leur trajectoire agricole (pratiques passées et actuelles : labour, fertilisation organique, fauche, pâturage) (Quétier *et al.*, 2007) (Fig. 6).



Figure 6. Prairie sur terrasse du col du Lautaret (Photo S. Aubert).

Sur les prairies terrassées, fertilisées et fauchées, la végétation est dominée par des espèces à croissance rapide (exploitatrices) tendant à maximiser l'acquisition des ressources (Poorter & Remkes, 1990 ; Van der Krift & Berendse, 2001). On retrouve dans ces prairies des espèces telles que *Dactylis glomerata*, *Trisetum flavescens*, *Geranium sylvaticum* ou *Gentiana lutea* ; ces prairies présentent la plus forte diversité spécifique et fonctionnelle sur le site (Quétier *et al.*, 2007). Cette forte diversité végétale qui est la particularité de ce site d'étude est permise par l'apport d'N par le fumier qui augmente la disponibilité des nutriments, originellement basse dans ces prairies. Lorsque ces prairies ne sont pas fertilisées mais fauchées et/ou pâturées, elles sont alors dominées par des espèces à croissance plus lente (conservatrices) qui présentent une plus faible capacité d'acquisition des nutriments (Tilman & Wedin, 1991 ; Elberse & Berendse, 1993). On observe une légère diminution de la diversité spécifique et fonctionnelle sur les terrasses fauchées mais une plus forte diminution pour celles qui sont pâturées. On retrouve dans ces prairies une végétation rase avec des espèces comme *Bromus erectus*, *Briza media*, *Sesleria caerulea* ou *Festuca ovina*.

Les prairies d'altitude, non fertilisées mais fauchées sont dominées par des espèces conservatrices comme *Festuca paniculata*, *Meum athamanticum*, *Festuca rubra* ou *Carex*

sempervirens. La richesse spécifique de ces prairies est d'un niveau intermédiaire. Enfin les prairies où la fauche a été abandonnée et où seul persiste un faible pâturage estival, sont fortement dominées (>70% de la biomasse de la communauté) par *Festuca paniculata* du fait de son inappétence. Bien qu'ayant des traits conservateurs sur certains aspects, cette espèce est très compétitive (Gross *et al.*, 2010) et produit une grande quantité de litière difficilement décomposable (Vittoz *et al.*, 2005, Quétier *et al.*, 2007) (Fig. 7) qui empêche le développement des autres espèces physiquement (ombrage, occupation du sol) ou chimiquement par libération de composés allélopathiques (Viard-Crétat *et al.*, 2010, 2012), ce qui ralentit le cycle des nutriments et entraîne une forte diminution de la diversité spécifique.

Les conditions abiotiques et les pratiques agricoles ont conduit à une modification des paramètres des sols, des communautés végétales de ces prairies subalpines. Cependant, les effets sur les communautés microbiennes restent inconnus.



Figure 7. Prairies de pente à fétuque au début de la saison de végétation. Touffes de *F. paniculata* identifiables à la quantité de litière présente au sol ou encore attachée à la plante (Photo F. Grassein).

2. Les changements d'utilisation des terres à l'origine de la spécificité des prairies

Dans les écosystèmes, les relations entre les communautés végétales et microbiennes et leurs effets sur les propriétés des écosystèmes sont multiples, complexes et partiellement incomprises. Cependant, la majorité des écosystèmes subissent une anthropisation dont l'intensité varie temporellement et géographiquement. Depuis des siècles, l'Homme a fortement façonné les paysages. Les milieux semi-naturels comme les prairies subalpines du Col du Lautaret possèdent une diversité végétale parmi les plus importantes d'Europe et cela est en partie lié aux pratiques agricoles employées au cours de l'Histoire (Girel *et al.*, 2010). L'utilisation des terres pour l'agriculture est à l'origine des altérations les plus visibles

sur les écosystèmes terrestres et est considérée comme l'un des facteurs majeurs engendrant une perte de biodiversité et une forte dégradation des habitats (Vitousek *et al.*, 1997). En fonction de l'intensité d'utilisation des terres agricoles (labour, fertilisation, fauche et élevage), des conséquences bénéfiques ou nuisibles sur les écosystèmes et notamment sur le fonctionnement du sol vont apparaître (Brussaard *et al.*, 1997). Dans le cas des prairies subalpines, y compris celles du Lautaret, on assiste depuis la moitié du XX^{ème} siècle à une extensification des pratiques qui peut dans certains cas aller jusqu'à un abandon (bien que celui-ci ne soit que très rare au Lautaret) (Tasser & Tappeiner, 2002 ; Quétier *et al.*, 2007) ayant un impact sur leur fonctionnement et les services écologiques qu'elles fournissent. En effet, dans les écosystèmes prairiaux où la disponibilité en nutriments est initialement intermédiaire, la fertilisation des terres par un ajout d'N entraîne une meilleure allocation des nutriments dans les feuilles de certaines espèces (Elberse & Berendse, 1993 ; McIntyre & Lavorel, 2007) induisant pour ces dernières une meilleure interception de la lumière (augmentation SLA et LNC) (Quétier *et al.*, 2007) qui favorise leurs capacités compétitives et diminue donc la diversité de certaines prairies (Bonanomi *et al.*, 2006). Mais dans le cas des prairies du Lautaret, la fertilisation se fait sous forme de fumure organique, augmentant la disponibilité des nutriments à un niveau qui permet à la fois une augmentation de la production végétale et de la diversité fonctionnelle et spécifique. Cela se traduit dans la communauté végétale par la coexistence d'espèces à stratégie conservatrice et d'espèces à stratégie exploitatrice (Gross *et al.*, 2009) (Fig. 8). Les auteurs expliquent cette coexistence par le fait que les espèces conservatrices, bien qu'ayant des capacités d'acquisition plus faibles que les exploitatrices, ont une efficacité d'utilisation des nutriments plus importante qui leur permet de produire plus de biomasse avec moins de nutriments (Maire *et al.*, 2009). D'autres mécanismes entrent en jeu tels que des différences de tolérance à l'ombrage qui facilitent là encore la coexistence d'espèces à stratégies d'acquisition des ressources (ici la lumière) différentes (Fridley, 2003 ; Gross *et al.* 2009). La fertilisation va également jouer directement et indirectement, *via* les traits végétaux, sur les communautés microbiennes. En effet, il a été montré que la fertilisation altérerait la composition des communautés microbiennes en terme d'abondance relative des bactéries et des champignons (utilisation des PLFA), puisque les communautés fongiques étaient en général plus abondantes dans les prairies non fertilisées (Bardgett & McAlister, 1999).

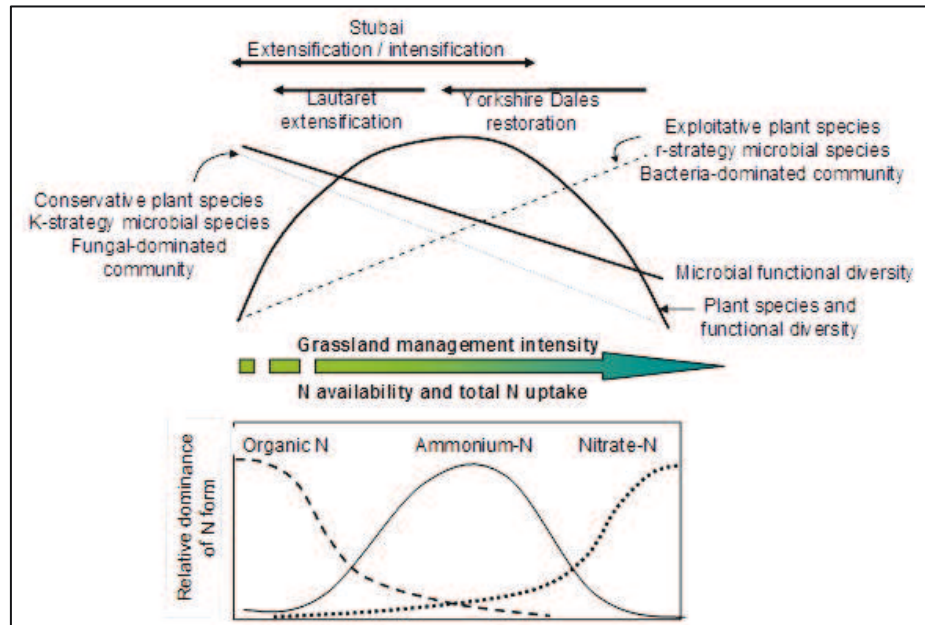


Figure 8. Représentation schématique du lien entre distribution relative des différentes formes d’N du sol et la diversité spécifique et fonctionnelle végétale. Les prairies du Lautaret se positionnent dans la gamme où la coexistence d’espèces est supposée maximale du fait de la coexistence d’espèces ayant des stratégies d’utilisation de ressources contrastées. (source : projet VITAL).

Ces changements sont liés à des effets indirects tel qu’un changement de composition et/ou de traits des communautés végétales (augmentation du LNC) qui entraînent un retour au sol d’une litière plus facilement décomposable favorable aux communautés bactériennes (Eskelinen *et al.*, 2009 ; Bardgett & Walker, 2004). Des études montrent également qu’à travers les réponses des plantes à la fertilisation, c’est à dire un changement des patrons d’exsudation (quantité et qualité) et de la biomasse racinaire (Bardgett *et al.*, 1999 ; Nguyen *et al.*, 2003), les traits végétaux vont influencer la taille et la diversité de la communauté microbienne présente dans la rhizosphère. **Cependant, les effets de la fertilisation restent controversés, avec des études qui rapportent des effets positifs comme négatifs sur la quantité et la qualité des exsudats (Denef *et al.*, 2009).** Enfin, la fertilisation peut affecter directement les communautés microbiennes par inhibition de la croissance des champignons décomposeurs (Donnison *et al.*, 2000), ou par suppression de certaines infections mycorhiziennes en diminuant la nécessité d’une symbiose et les dépenses en C des plantes qui alimentent ces champignons (Johnson *et al.*, 2003 ; Urcelay *et al.*, 2003 ; Leake *et al.*, 2005). La fauche et le pâturage vont également avoir un impact sur le fonctionnement de l’écosystème. Ces deux types de gestion aboutissent globalement à la même perturbation sur l’écosystème c’est-à-dire à une défoliation et une exportation de biomasse végétale. Cependant, la fauche entraîne une défoliation complète de la communauté végétale alors que

le degré de perturbation par le pâturage va dépendre du nombre et du type d'animaux sur la parcelle (Stewart & Pullin, 2008). L'exportation de biomasse végétale par les mammifères varie selon la morphologie de leurs mâchoires et selon leur sélection des espèces végétales consommées (Van der Wal *et al.* 2000). Au niveau du sol, dans les deux cas, ces pratiques entraînent un tassement du sol (Drewry, 2006), mais le pâturage entraîne un retour au sol partiel des nutriments *via* les fèces et les urines favorable à la productivité primaire (Bardgett & Wardle, 2003). D'une manière générale, la défoliation induit une augmentation au moins à court terme de l'exsudation racinaire et, par conséquent, permet une augmentation de la biomasse microbienne (Paterson & Sim, 1999 ; Murray *et al.*, 2004; Hamilton & Franck, 2001). La minéralisation de l'N organique du sol est favorisée ainsi que la disponibilité en nutriment pour les plantes et par conséquent, leur productivité (Bardgett & Wardle, 2003). Le pâturage et la fauche conduisent également à un changement de composition des communautés végétales (Zeller *et al.*, 2001), et donc de la quantité et de la qualité des composés exsudés (De Deyn *et al.*, 2008). Les effets de la défoliation sur la productivité racinaire sont plus contrastés, une synthèse bibliographique sur l'herbivorie a rapporté à la fois des stimulations et des diminutions de la biomasse racinaire (Milchunas & Lauenroth, 1993). Ces effets dépendent évidemment de la fertilité initiale du milieu qui joue sur les traits des communautés végétales.

L'herbivorie dans les milieux fertiles entraîne une forte consommation de la biomasse aérienne riche en N, le retour de la litière au sol est donc réduit. Cependant, cette litière riche en N va stimuler la minéralisation de l'N et les communautés bactériennes. A l'opposé, dans les milieux pauvres, la consommation de la biomasse aérienne riche en composés secondaires est plus faible (Eskelinen *et al.*, 2009) menant par conséquent à un fort retour de litière au sol. Cette litière difficilement décomposable (Aerts *et al.*, 1999), va ralentir le recyclage des nutriments et favoriser les communautés fongiques (Wardle *et al.*, 2004).

Dans le cas des prairies du Lautaret ou d'autres prairies subalpines, ces différentes pratiques agricoles sont présentes en raison d'une extensification croissante de l'utilisation des terres qui a généré un gradient d'intensité d'utilisation agricole. La diminution ou l'arrêt de la fauche et son remplacement par le pâturage ont entraîné une diminution des stocks et des flux N associés à un développement des espèces conservatrices et notamment des Poacées (Zeller *et al.*, 2001 ; Robson *et al.*, 2007) aux dépens des espèces exploitatrices. Les espèces conservatrices favorisées par l'arrêt de la fauche entraînent un ralentissement du cycle de l'azote (Robson *et al.*, 2010). **Ce ralentissement conduit à une augmentation du rapport C/N microbien suggérant un changement de composition de la communauté**

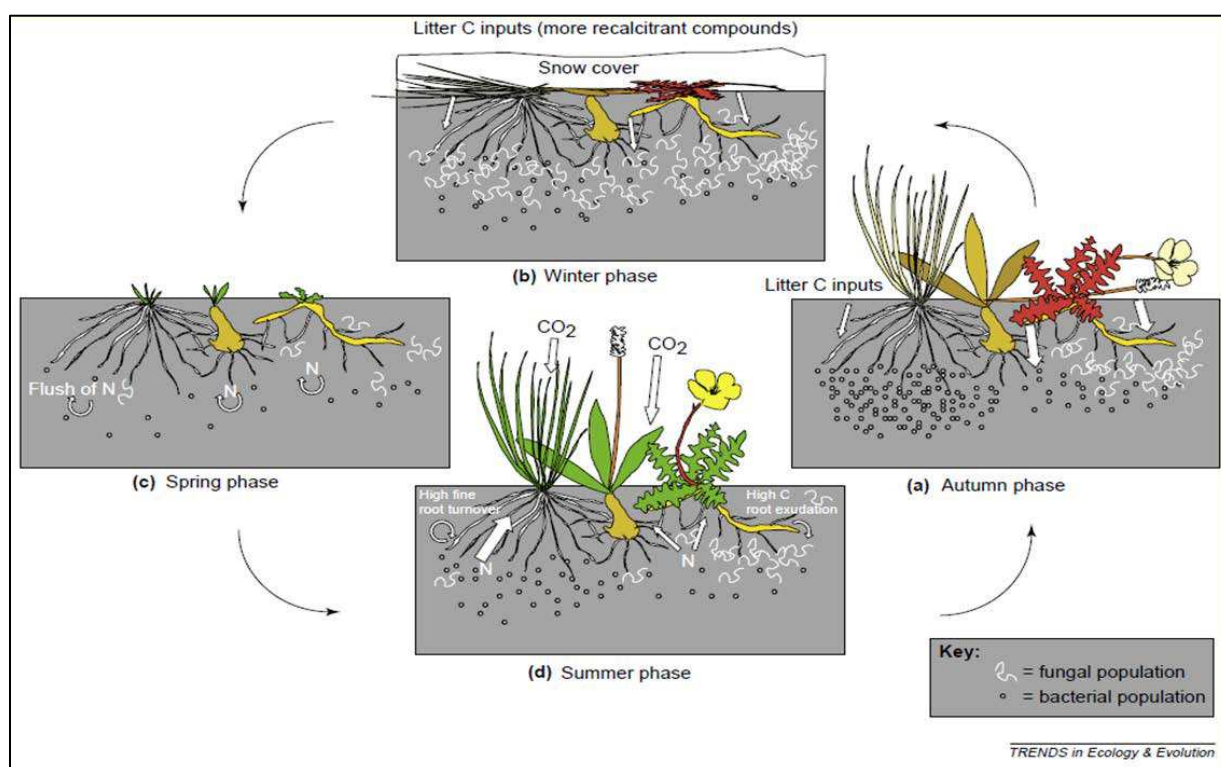
microbienne en faveur des champignons, même si les quantités d’N assimilées par ces microorganismes semblent inchangées (Zeller *et al.*, 2000 ; Robson *et al.*, 2010).

Ces études suggèrent que dans les prairies subalpines, l’abandon des pratiques agricoles traditionnelles (fertilisation, fauche ou pâturage) induisent des changements importants pour les communautés végétales et microbiennes et pour les processus écosystémiques qu’elles influencent. Il s’en suit une dégradation des services écosystémiques: perte d’espèces à valeur patrimoniale, diminution de la qualité de l’eau, du foin ou des capacités de rétention des nutriments (Lavorel *et al.*, 2011). Cependant les mécanismes impliqués dans ces changements de propriétés écosystémiques ne sont pas connus. **L’identification des mécanismes pilotant ces changements couplés dans les communautés végétales et microbiennes nous permettra de comprendre l’impact de ces pratiques agricoles sur les relations plantes-plantes et plantes-microorganismes, sur le cycle de l’azote et plus globalement sur le fonctionnement des prairies subalpines et les services qu’elles fournissent à la société.**

3. L’étage subalpin : un milieu contraignant soumis aux variations saisonnières

L’écosystème subalpin est un milieu soumis à des conditions climatiques rudes puisque l’altitude, qui est un gradient complexe, interagit avec d’autres facteurs comme la température, la pluviométrie, l’enneigement et la durée de végétation, la luminosité et la force du vent (Korner, 1999). Comme pour de nombreux écosystèmes (Kaye & Hart, 1997), l’N est limitant dans la plupart des sols où 90% de l’N est sous forme organique peu disponible et dont 20 à 40% sont constitués d’acides aminés (Senwo & Tabatabai, 1998). Or dans ces milieux, le taux de minéralisation de la matière organique est fortement contraint par les conditions climatiques (Bardgett *et al.*, 2007), et l’N inorganique préférentiellement absorbé par les plantes (Harrison *et al.*, 2007) est donc présent en petites quantités. Les microorganismes du sol sont également sous l’influence des conditions du milieu et notamment des variations saisonnières de température (Mancinelli, 1984), entraînant des fluctuations de taille et de composition des communautés microbiennes. Un changement de structure et de fonction des communautés microbiennes a lieu entre l’hiver et l’été. Celles de l’hiver possèdent un rapport F : B plus élevé, sont plus adaptées aux températures froides. Elles utilisent alors des substrats plus complexes (cellulose, acide vanillique) que les acides aminés simples (glycine) que les communautés microbiennes en été (Lipson *et al.*, 2002). La dominance des champignons dans les sols froids s’explique par le fait que la croissance

microbienne soit alimentée par la décomposition en hiver de polymères organiques et de composés phénoliques comme les tannins issus des résidus végétaux (Baptist *et al.*, 2008). En été, elle dépend de composés plus simples associés aux exsudats racinaires et au turnover des microorganismes (Schadt *et al.*, 2003 ; Lipson & Schmidt, 2004 ; Bardgett *et al.*, 2005) (Fig. 9). **La fonte des neiges** est une des périodes de l'année où a lieu un turnover des communautés microbiennes lors des cycles répétés de gel/dégel (Schimel & Klein, 1996). Ces conditions entraînent soit une diminution drastique de la biomasse microbienne (Jaeger *et al.*, 1999), soit une quiescence microbienne qui consiste en un état dormant dans les environnements stressants (Malik & Smith, 2006). De telles variations saisonnières peuvent avoir de fortes répercussions sur les relations plantes-microorganismes, en affectant l'absorption d'N par les plantes, ainsi que les activités et la biomasse microbiennes (Schmidt *et al.*, 2007). Il est bien connu que les communautés végétales et microbiennes sont en compétition pour l'N au cours de la saison de croissance des végétaux, et particulièrement au pic de production de biomasse aérienne.



En effet, dans une étude sur un écosystème montagnard, Bardgett *et al.* (2002) ont montré qu'en mai l'espèce végétale dominante dérivait l'N de ses réserves ou de l'absorption par ses

racines actives, alors qu'en juin, elle utilisait l'N résiduel des besoins microbiens. Dans des prairies alpines, Jaeger *et al.* (1999) expliquent ces variations saisonnières par les cycles de gel/dégel qui limitent la croissance microbienne. Cette croissance est minimale en début de saison permettant une forte exploitation du pool d'N disponible dans le sol par les plantes, alors que les microorganismes exploitent ce pool plus efficacement après la sénescence des plantes (lorsque la biomasse microbienne est maximale) et avant les gelées d'hiver. Cependant, les preuves de cette dynamique sont limitées aux écosystèmes alpins et de hautes latitudes. **Des processus similaires sont suspectés dans des écosystèmes proches tels que les prairies subalpines** caractérisées par des conditions climatiques légèrement plus favorables avec une saison de croissance de la végétation plus longue, des températures moyennes plus élevées mais aussi des cycles de gel/dégel plus fréquents (Saccone *et al.*, 2013), mais elles n'ont jamais été démontrées. Plus globalement, des études détaillées sur ces processus dans les prairies subalpines permettraient de mieux comprendre leur fonctionnement et de mieux y prédire l'impact du changement d'utilisation des terres et des changements climatiques.

III. Objectifs et structure de la thèse

1. Objectifs

Les propriétés des écosystèmes et les services fournis qui bénéficient à l'Homme sont fortement affectés par le changement d'utilisation des terres dans les prairies subalpines. La menace principale est liée à un abandon progressif des pratiques agricoles traditionnelles qui entraîne une baisse de diversité végétale et de productivité primaire nette. A travers ces changements, les services écosystémiques qui soutiennent l'économie locale pourraient être modifiés (Lavorel *et al.*, 2011, Lamarque *et al.*, in revision). Beaucoup de ces services sont influencés par la gestion des prairies et donc dépendent de ses effets sur les relations entre communautés végétales, communautés microbiennes et propriétés du sol. Il est bien admis que les rétro-contrôles dans les relations plantes-microorganismes sont des facteurs majeurs de la régulation des services écosystémiques (Cleveland *et al.*, 1999; Diaz *et al.*, 2007; Van der Heijden *et al.*, 2008), mais les mécanismes sous-jacents impliqués dans ces relations et le(s) rôle(s) qu'ils jouent dans la fourniture des services par l'écosystème prairial sont encore largement incompris. **Ma thèse a donc pour objectif principal de mieux comprendre les inter-relations entre les traits fonctionnels végétaux et microbiens, et le fonctionnement de l'écosystème**, en particulier autour du cycle de l'N, prenant les prairies subalpines comme modèle d'étude.

J'ai décliné cet objectif principal en quatre sous-objectifs :

- i) Déterminer quelles influences les traits végétaux ont sur la variation des paramètres fonctionnels microbiens.
- ii) Déterminer la contribution des traits végétaux aux variations de composition et d'activités des communautés microbiennes, alors que les paramètres du sol sont reconnus comme étant les facteurs majeurs.
- iii) Déterminer la contribution, individuelle et partagée, des traits fonctionnels végétaux, des paramètres fonctionnels microbiens et des paramètres du sol aux variations entre types de prairies du fonctionnement de l'écosystème et donc de la fourniture de services écosystémiques.

iv) Décrire l'effet des variations saisonnières et de l'utilisation des terres sur les relations plantes-microorganismes des sols, notamment en termes de compétition pour les nutriments.

Tout au long de mes recherches, je me suis attaché à l'étude des traits fonctionnels végétaux souterrains. Les racines sont les organes des plantes qui sont le plus étroitement liés aux microorganismes du sol. Je suis donc parti du postulat que les effets des traits racinaires étaient plus forts que ceux des traits végétaux aériens bien que les deux soient évidemment liés. Enfin, je me suis intéressé aux variations spatiales et temporelles, et spécifiquement aux effets des changements de la gestion des prairies de montagne sur la dynamique de l'N puisque c'est l'un des éléments à la base des relations plantes-microorganismes. L'étude des variations spatio-temporelles de cette dynamique m'a permis de mieux cerner les relations de compétition pour ce nutriment entre les communautés végétales et microbiennes du sol.

2. Structure de la thèse

Après une présentation des différentes méthodes employées au cours des expérimentations mises en place pour comprendre les interactions dans le système sol-plantes-microorganismes (chapitre 2), je présenterai les résultats de ce travail de thèse en 4 chapitres reflétant la démarche expérimentale qui a consisté à complexifier le système d'étude selon le niveau de contrôle des conditions abiotiques (Fig. 10). Enfin, la discussion synthétisera les principaux résultats, leurs interprétations publiées, soumises à publication et personnelles, ainsi que leurs apports dans la compréhension des relations plantes-microorganismes du sol dans le cadre de la quantification / de la compréhension du fonctionnement des écosystèmes, en particulier en ce qui concerne le cycle de l'azote.

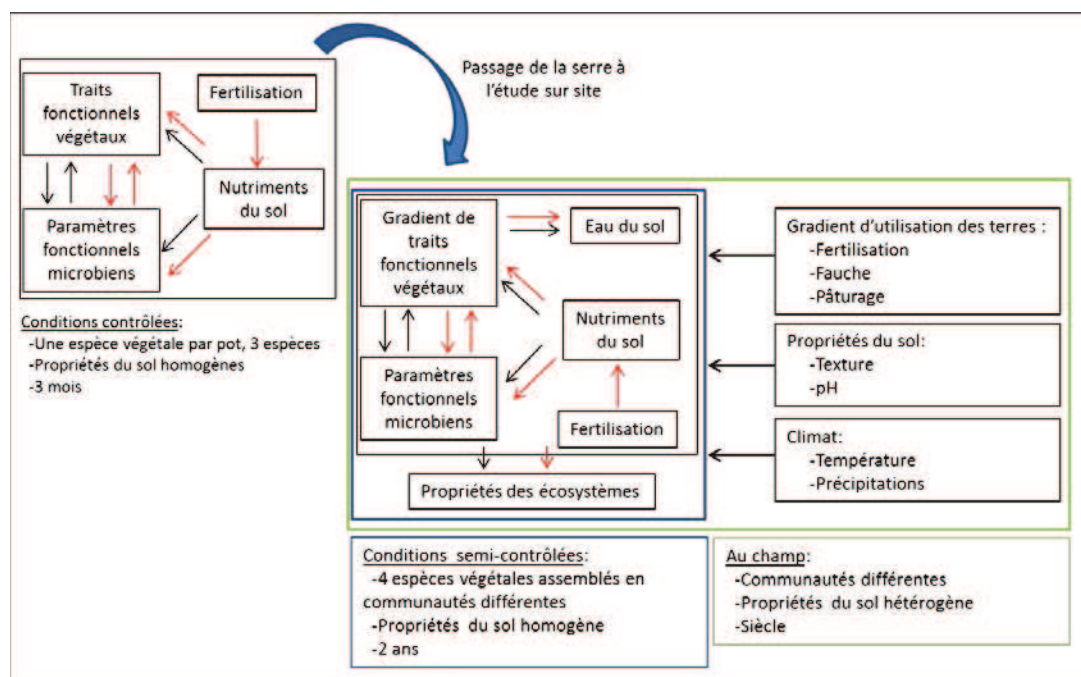


Figure 10 : Schéma représentant la complexification des systèmes d'étude par diminution du contrôle des variables abiotiques, augmentation du temps d'expérimentation et de la gamme de traits fonctionnels végétaux. Les couleurs de flèches symbolisent les deux conditions de disponibilité de l'azote mise en place en conditions contrôlées (sans (noires) ou avec ajout d'azote (rouges)).

Chapitre 2. Ce chapitre détaillera les principales méthodes utilisées au cours des différentes expérimentations. Les différents dispositifs expérimentaux seront décrits succinctement ainsi que les avantages et les inconvénients qu'ils ont présentés pour répondre à mes questions.

Chapitre 3. Ce chapitre explore les relations entre plantes et microorganismes à l'échelle de l'individu et de l'espèce végétale. Il présente les effets des plantes sur la colonisation mycorhizienne et l'activité des communautés microbiennes. Les résultats de l'expérimentation de ce chapitre sont présentés sous forme d'un **projet d'article** à partir de premières analyses exploratoires du jeu de données.

En annexe de ce chapitre, je présente un article qui, à partir d'une méthode de marquage isotopique, caractérise les différences de patrons de rhizodéposition de 4 espèces végétales. Il est important de noter que **ma participation** sur cet article annexe **est mineure** puisque je n'ai participé qu'à une partie de sa rédaction (voir détails dans le chapitre 2).

-Legay N, Grassein F, Puissant J, Personeni E, Perigon S, Binet M-N, Poly F, Pommier T, Clément J-C, Geremia RA, Arnoldi C, Lavorel S and Mouhamadou B. Impacts of grass species with contrasting plant resource economies on rhizosphere microbial communities.

- Baptist F, Aranjuelo I, Legay N, Lopez Sangil L, Molero G, Ba Forne S, Rovira P, Nogues S. Rhizodeposition of organic carbon by plants of contrasting strategies for resource acquisition: responses to different fertility regimes. En preparation pour *Journal of Experimental Botany*.

Chapitre 4. Ce chapitre évalue les effets conjoints des traits fonctionnels végétaux, des paramètres fonctionnels microbiens et des paramètres du sol sur les propriétés d'un écosystème artificiel.

Il est l'objet d'un article en préparation pour *Journal of Ecology*.

-Legay N, Lavorel S, Baxendale C, Krainer U, Cantarel A, Kastl E, Colace M.-P, Bahn M, Grigulis K, Poly F, Pommier T, Schlöter M, Clément J.-C and R.D. Bardgett. Plant – soil – microorganism interactions associated with bundles of ecosystem services in mountain grasslands. En preparation.

Chapitre 5. Ce chapitre propose, à partir d'une méthode statistique pour comparer les résultats obtenus sur trois sites différents en Europe, d'une part de comparer la contribution des traits végétaux à celles des paramètres du sol sur les paramètres fonctionnels microbiens, et d'autre part, d'évaluer la contribution relative des traits fonctionnels végétaux et microbiens sur les propriétés de l'écosystème.

Il est l'objet d'un article publié dans *Journal of Ecology* et d'un second article soumis à *Ecology*:

-Grigulis K, Lavorel S, Krainer U, Legay N, Baxendale Catherine, Dumont M, Kastl E, Arnoldi C, Bardgett RD, Poly F, Pommier T, Schlöter M, Tappeiner U, Bahn M, Clément JC, 2013. Combined influence of plant and microbial functional traits on ecosystem processes in mountain grasslands. *Journal of Ecology* 101: 47-57.

- Legay N, Baxendale C, Grigulis K, Krainer U, Kastl E, Schlöter M, Bardgett R,D, Arnoldi C, Bahn M, Dumont M, Poly F, Pommier T, Clément JC, Lavorel S. Influence of above- and below-ground plant traits on the structure and function of grassland soil microbial communities. *Ecology* (soumis)

Chapitre 6. Ce chapitre explore les effets des variations saisonnières sur l'absorption de l'N par trois espèces d'herbacées caractéristiques des prairies subalpines du Lautaret, et sur la compétition pour l'N entre les communautés végétales et les communautés microbiennes.

Ce chapitre fait l'objet de deux articles, l'un soumis à *Journal of Ecology*, l'autre à *Biogeosciences*.

-Grassein F., Legay N., Laîné P., Arnoldi C., Lavorel S., Segura R., Clément J.C. The leaf economic spectrum captures the whole plant functioning of species. *Journal of Ecology* (soumis).

-Legay N., Grassein F., Personeni E., Bataillé M.P., Robson T.M., Lavorel S., Clément J.C. Nitrogen uptake dynamics after snowmelt and peak biomass between plant and soil communities in subalpine grasslands. *Biogeoscience* (soumis).

Les chapitres 3 à 6 rédigés sous formes d'articles pour des revues sont présentés tels qu'ils le sont lors de leur soumission, ou dans l'état actuel de leur préparation. Comme ils peuvent être lus indépendamment les uns des autres, certaines redondances apparaissent entre les chapitres. Au début et à la fin de chaque chapitre, un remplacement dans le cadre de ma thèse et une synthèse en français font le lien entre les résultats obtenus ou soumis et, à l'occasion, avec des résultats supplémentaires.

Références citées

- Aerts, R. 1996. Nutrient resorption from senescing leaves of perennials: Are there general patterns? *Journal Of Ecology* **84**:597-608.
- Aerts, R. 1999. Interspecific competition in natural plant communities: mechanisms, trade-offs and plant-soil feedbacks. *Journal Of Experimental Botany* **50**:29-37.
- Amoroso, A., F. Domine, G. Esposito, S. Morin, J. Savarino, M. Nardino, M. Montagnoli, J. M. Bonneville, J. C. Clement, A. Ianniello, and H. J. Beine. 2010. Microorganisms in Dry Polar Snow Are Involved in the Exchanges of Reactive Nitrogen Species with the Atmosphere. *Environmental Science & Technology* **44**:714-719.
- Ansquer, P., M. Duru, J. P. Theau, and P. Cruz. 2009. Functional traits as indicators of fodder provision over a short time scale in species-rich grasslands. *Annals Of Botany* **103**:117-126.
- Attard, E., F. Poly, C. Commeaux, F. Laurent, A. Terada, B. F. Smets, S. Recous, and X. Le Roux. 2010. Shifts between Nitrospira- and Nitrobacter-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. *Environmental Microbiology* **12**:315-326.
- Attard, E., S. Recous, A. Chabbi, C. De Berranger, N. Guillaumaud, J. Labreuche, L. Philippot, B. Schmid, and X. Le Roux. 2011. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology* **17**:1975-1989.
- Aulakh, M. S., T. S. Khera, and J. W. Doran. 2000. Mineralization and denitrification in upland, nearly saturated and flooded subtropical soil - I. Effect of nitrate and ammoniacal nitrogen. *Biology And Fertility Of Soils* **31**:162-167.
- Bannert, A., K. Kleineidam, L. Wissing, C. Mueller-Niggemann, V. Vogelsang, G. Welzl, Z. H. Cao, and M. Schlöter. 2011. Changes in Diversity and Functional Gene Abundances of Microbial Communities Involved in Nitrogen Fixation, Nitrification, and Denitrification in a Tidal Wetland versus Paddy Soils Cultivated for Different Time Periods. *Applied And Environmental Microbiology* **77**:6109-6116.
- Baptist, F., L. Zinger, J. C. Clement, C. Gallet, R. Guillemin, J. M. F. Martins, L. Sage, B. Shahnavaz, P. Choler, and R. Geremia. 2008. Tannin impacts on microbial diversity and the functioning of alpine soils: a multidisciplinary approach. *Environmental Microbiology* **10**:799-809.
- Bardgett, R.D. 2005. *The Biology of Soil: A Community and Ecosystem Approach*. Oxford University Press.
- Bardgett, R. D., W. D. Bowman, R. Kaufmann, and S. K. Schmidt. 2005. A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *Trends In Ecology & Evolution* **20**:634-641.
- Bardgett, R. D., P. J. Hobbs, and A. Frostegard. 1996. Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology And Fertility Of Soils* **22**:261-264.
- Bardgett, R. D., A. C. Jones, D. L. Jones, S. J. Kemmitt, R. Cook, and P. J. Hobbs. 2001. Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* **33**:1653-1664.
- Bardgett, R. D., J. L. Mawdsley, S. Edwards, P. J. Hobbs, J. S. Rodwell, and W. J. Davies. 1999. Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of temperate upland grasslands. *Functional Ecology* **13**:650-660.
- Bardgett, R. D. and E. McAlister. 1999. The measurement of soil fungal : bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology And Fertility Of Soils* **29**:282-290.
- Bardgett, R. D., T. C. Streeter, L. Cole, and I. R. Hartley. 2002. Linkages between soil biota, nitrogen availability, and plant nitrogen uptake in a mountain ecosystem in the Scottish Highlands. *Applied Soil Ecology* **19**:121-134.

- Bardgett, R. D., R. van der Wal, I. S. Jonsdottir, H. Quirk, and S. Dutton. 2007. Temporal variability in plant and soil nitrogen pools in a high-Arctic ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* **39**:2129-2137.
- Bardgett, R. D. and L. R. Walker. 2004. Impact of coloniser plant species on the development of decomposer microbial communities following deglaciation. *Soil Biology & Biochemistry* **36**:555-559.
- Bardgett, R.D. & Wardle, D.A. 2010. Aboveground-Belowground Linkages - Biotic Interactions, Ecosystem Processes and Global Change. Oxford University press, New York.
- Bardgett, R. D. and D. A. Wardle. 2003. Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. *Ecology* **84**:2258-2268.
- Belnap, J. 2003. The world at your feet: desert biological soil crusts. *Frontiers in Ecology and the Environment* **1**:181-189.
- Bever, J. D. 2003. Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytologist* **157**:465-473.
- Birouste, M., E. Kazakou, A. Blanchard, and C. Roumet. 2012. Plant traits and decomposition: are the relationships for roots comparable to those for leaves? *Annals Of Botany* **109**:463-472.
- Bonanomi, G., S. Caporaso, and M. Allegranza. 2006. Short-term effects of nitrogen enrichment, litter removal and cutting on a Mediterranean grassland. *Acta Oecologica-International Journal Of Ecology* **30**:419-425.
- Bremer, C., G. Braker, D. Matthies, A. Reuter, C. Engels, and R. Conrad. 2007. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of nirK-Type denitrifier communities in soil. *Applied And Environmental Microbiology* **73**:6876-6884.
- Brooks, P. D., M. W. Williams, and S. K. Schmidt. 1998. Inorganic nitrogen and microbial biomass dynamics before and during spring snowmelt. *Biogeochemistry* **43**:1-15.
- Brussaard, L., V. M. Behan-Pelletier, D. E. Bignell, V. K. Brown, W. Didden, P. Folgarait, C. Fragoso, D. W. Freckman, V. Gupta, T. Hattori, D. L. Hawksworth, C. Klopatek, P. Lavelle, D. W. Malloch, J. Rusek, B. Soderstrom, J. M. Tiedje, and R. A. Virginia. 1997. Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *Ambio* **26**:563-570.
- Chapin, F. S. 1980. The Mineral-Nutrition Of Wild Plants. *Annual Review Of Ecology And Systematics* **11**:233-260.
- Chapin, F.S., Matson, P.A. & Mooney, H.A. 2002. Principles of terrestrial ecosystems ecology. Springer, NY.
- Clement, J. C., R. M. Holmes, B. J. Peterson, and G. Pinay. 2003. Isotopic investigation of denitrification in a riparian ecosystem in western France. *Journal of Applied Ecology* **40**:1035-1048.
- Clement, J. C., T. M. Robson, R. Guillemin, P. Saccone, J. Locket, S. Aubert, and S. Lavorel. 2012. The effects of snow-N deposition and snowmelt dynamics on soil-N cycling in marginal terraced grasslands in the French Alps. *Biogeochemistry* **108**:297-315.
- Cleveland, C. C., A. R. Townsend, D. S. Schimel, H. Fisher, R. W. Howarth, L. O. Hedin, S. S. Perakis, E. F. Latty, J. C. Von Fischer, A. Elseroad, and M. F. Wasson. 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N-2) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* **13**:623-645.
- Costanza, R., R. d'Arge, R. deGroot, S. Farber, M. Grasso, B. Hannon, K. Limburg, S. Naeem, R. V. Oneill, J. Paruelo, R. G. Raskin, P. Sutton, and M. vandenBelt. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* **387**:253-260.
- Craine, J.M. 2009. Resource Strategies of Wild Plants. Princeton University Press.
- Craine, J. M., D. Tilman, D. Wedin, P. Reich, M. Tjoelker, and J. Knops. 2002. Functional traits, productivity and effects on nitrogen cycling of 33 grassland species. *Functional Ecology* **16**:563-574.
- Dakora, F. D. and D. A. Phillips. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant And Soil* **245**:35-47.

- Dassonville, N., N. Guillaumaud, F. Piola, P. Meerts, and F. Poly. 2011. Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions* **13**:1115-1133.
- De Deyn, G. B., J. H. C. Cornelissen, and R. D. Bardgett. 2008. Plant functional traits and soil carbon sequestration in contrasting biomes. *Ecology Letters* **11**:516-531.
- de Vries, F. T., P. Manning, J. R. B. Tallowin, S. R. Mortimer, E. S. Pilgrim, K. A. Harrison, P. J. Hobbs, H. Quirk, B. Shipley, J. H. C. Cornelissen, J. Kattge, and R. D. Bardgett. 2012. Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecology Letters* **15**:1230-1239.
- Denef, K., D. Roobroeck, M. Wadu, P. Lootens, and P. Boeckx. 2009. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* **41**:144-153.
- Diaz, S. and M. Cabido. 2001. Vive la difference: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends In Ecology & Evolution* **16**:646-655.
- Diaz, S., M. Cabido, and F. Casanoves. 1998. Plant functional traits and environmental filters at a regional scale. *Journal Of Vegetation Science* **9**:113-122.
- Diaz, S., S. Lavorel, F. de Bello, F. Quetier, K. Grigulis, and M. Robson. 2007. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **104**:20684-20689.
- Dijkstra, F. A., S. E. Hobbie, and P. B. Reich. 2006. Soil processes affected by sixteen grassland species grown under different environmental conditions. *Soil Science Society Of America Journal* **70**:770-777.
- Donnison, L. M., G. S. Griffith, J. Hedger, P. J. Hobbs, and R. D. Bardgett. 2000. Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales. *Soil Biology & Biochemistry* **32**:253-263.
- Drewry, J. J. 2006. Natural recovery of soil physical properties from treading damage of pastoral soils in New Zealand and Australia: A review. *Agriculture Ecosystems & Environment* **114**:159-169.
- Dunn, R. M., J. Mikola, R. Bol, and R. D. Bardgett. 2006. Influence of microbial activity on plant-microbial competition for organic and inorganic nitrogen. *Plant And Soil* **289**:321-334.
- Eissenstat, D. 2000. Root structure and function in an ecological context. *New Phytologist* **148**:353-354.
- Elberse, W. T. and F. Berendse. 1993. A Comparative-Study Of The Growth And Morphology Of 8 Grass Species From Habitats With Different Nutrient Availabilities. *Functional Ecology* **7**:223-229.
- Eskelinen, A., S. Stark, and M. Mannisto. 2009. Links between plant community composition, soil organic matter quality and microbial communities in contrasting tundra habitats. *Oecologia* **161**:113-123.
- Fahey, T. J., J. J. Battles, and G. F. Wilson. 1998. Responses of early successional northern hardwood forests to changes in nutrient availability. *Ecological Monographs* **68**:183-212.
- Falcão Salles, J., X. Le Roux, and F. Poly. 2012. Relating phylogenetic and functional diversity among denitrifiers and quantifying their capacity to predict community functioning. *Frontiers in Microbiology* **3**.
- Fenn, M. E., J. S. Baron, E. B. Allen, H. M. Rueth, K. R. Nydick, L. Geiser, W. D. Bowman, J. O. Sickman, T. Meixner, D. W. Johnson, and P. Neitlich. 2003. Ecological effects of nitrogen deposition in the western United States. *Bioscience* **53**:404-420.
- Fierer, N. and R. B. Jackson. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **103**:626-631.
- Fridley, J. D. 2003. Diversity effects on production in different light and fertility environments: an experiment with communities of annual plants. *Journal Of Ecology* **91**:396-406.
- Garnett, T. P. and P. J. Smethurst. 1999. Ammonium and nitrate uptake by *Eucalyptus nitens*: effects of pH and temperature. *Plant And Soil* **214**:133-140.

- Garnier, E., J. Cortez, G. Billes, M. L. Navas, C. Roumet, M. Debussche, G. Laurent, A. Blanchard, D. Aubry, A. Bellmann, C. Neill, and J. P. Toussaint. 2004. Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology* **85**:2630-2637.
- Garnier, E., S. Lavorel, P. Ansquer, H. Castro, P. Cruz, J. Dolezal, O. Eriksson, C. Fortunel, H. Freitas, C. Golodets, K. Grigulis, C. Jouany, E. Kazakou, J. Kigel, M. Kleyer, V. Lehsten, J. Leps, T. Meier, R. Pakeman, M. Papadimitriou, V. P. Papanastasis, H. Quested, F. Quetier, M. Robson, C. Roumet, G. Rusch, C. Skarpe, M. Sternberg, J. P. Theau, A. Thebault, D. Vile, and M. P. Zarovali. 2007. Assessing the effects of land-use change on plant traits, communities and ecosystem functioning in grasslands: A standardized methodology and lessons from an application to 11 European sites. *Annals Of Botany* **99**:967-985.
- Garnier, E. and M. L. Navas. 2012. A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**:365-399.
- Grayston, S. J., S. Q. Wang, C. D. Campbell, and A. C. Edwards. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* **30**:369-378.
- Griffiths, B. S., K. Ritz, N. Ebbelwhite, and G. Dobson. 1999. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology & Biochemistry* **31**:145-153.
- Grime, J. P. 1998. Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal Of Ecology* **86**:902-910.
- Gross, N., G. Kunstler, P. Liancourt, F. de Bello, K. N. Suding, and S. Lavorel. 2009. Linking individual response to biotic interactions with community structure: a trait-based framework. *Functional Ecology* **23**:1167-1178.
- Gross, N., P. Liancourt, P. Choler, K. N. Suding, and S. Lavorel. 2010. Strain and vegetation effects on local limiting resources explain the outcomes of biotic interactions. *Perspectives In Plant Ecology Evolution And Systematics* **12**:9-19.
- Gross, N., K. N. Suding, S. Lavorel, and C. Roumet. 2007. Complementarity as a mechanism of coexistence between functional groups of grasses. *Journal Of Ecology* **95**:1296-1305.
- Hamilton, E. W. and D. A. Frank. 2001. Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass. *Ecology* **82**:2397-2402.
- Harrison, K. A. and R. D. Bardgett. 2010. Influence of plant species and soil conditions on plant-soil feedback in mixed grassland communities. *Journal Of Ecology* **98**:384-395.
- Harrison, K. A., R. Bol, and R. D. Bardgett. 2007. Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. *Ecology* **88**:989-999.
- Harrison, K. A., R. Bol, and R. D. Bardgett. 2008. Do plant species with different growth strategies vary in their ability to compete with soil microbes for chemical forms of nitrogen? *Soil Biology & Biochemistry* **40**:228-237.
- Hawkins, B. A., R. Field, H. V. Cornell, D. J. Currie, J. F. Guegan, D. M. Kaufman, J. T. Kerr, G. G. Mittelbach, T. Oberdorff, E. M. O'Brien, E. E. Porter, and J. R. G. Turner. 2003. Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. *Ecology* **84**:3105-3117.
- Haynes, R. J. and R. S. Swift. 1986. EFFECTS OF SOIL ACIDIFICATION AND SUBSEQUENT LEACHING ON LEVELS OF EXTRACTABLE NUTRIENTS IN A SOIL. *Plant And Soil* **95**:327-336.
- Henry, S., S. Texier, S. Hallet, D. Bru, C. Dambreville, D. Cheneby, F. Bizouard, J. C. Germon, and L. Philippot. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environmental Microbiology* **10**:3082-3092.
- Hodge, A., J. Stewart, D. Robinson, B. S. Griffiths, and A. H. Fitter. 2000. Competition between roots and soil micro-organisms for nutrients from nitrogen-rich patches of varying complexity. *Journal Of Ecology* **88**:150-164.
- Hogberg, P., A. Nordgren, N. Buchmann, A. F. S. Taylor, A. Ekblad, M. N. Hogberg, G. Nyberg, M. Ottosson-Lofvenius, and D. J. Read. 2001. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature* **411**:789-792.
- Hooper, D. U. and P. M. Vitousek. 1997. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science* **277**:1302-1305.

- Jaeger, C. H., R. K. Monson, M. C. Fisk, and S. K. Schmidt. 1999. Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. *Ecology* **80**:1883-1891.
- Johnson, N. C., D. L. Rowland, L. Corkidi, L. M. Egerton-Warburton, and E. B. Allen. 2003. Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. *Ecology* **84**:1895-1908.
- Jones, D. L., A. Hodge, and Y. Kuzyakov. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* **163**:459-480.
- Kaye, J. P. and S. C. Hart. 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends In Ecology & Evolution* **12**:139-143.
- Keddy, P. A. 1992. Assembly And Response Rules - 2 Goals For Predictive Community Ecology. *Journal Of Vegetation Science* **3**:157-164.
- Kirwan, L., J. Connolly, J. A. Finn, C. Brophy, A. Luscher, D. Nyfeler, and M. T. Sebastia. 2009. Diversity-interaction modeling: estimating contributions of species identities and interactions to ecosystem function. *Ecology* **90**:2032-2038.
- Klanderud, K. and O. Totland. 2005. The relative importance of neighbours and abiotic environmental conditions for population dynamic parameters of two alpine plant species. *Journal Of Ecology* **93**:493-501.
- Klironomos, J. N. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* **417**:67-70.
- Koper, T. E., J. M. Stark, M. Y. Habteselassie, and J. M. Norton. 2010. Nitrification exhibits Haldane kinetics in an agricultural soil treated with ammonium sulfate or dairy-waste compost. *Fems Microbiology Ecology* **74**:316-322.
- Kowalchuk, G. A., D. S. Buma, W. de Boer, P. G. L. Klinkhamer, and J. A. van Veen. 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology* **81**:509-520.
- Kuzyakov, Y. 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:425-448.
- Kuzyakov, Y. and X. Xu. 2013. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist* **198**:656-669.
- Laughlin, D. C. 2011. Nitrification is linked to dominant leaf traits rather than functional diversity. *Journal Of Ecology* **99**:1091-1099.
- Lavorel, S. and E. Garnier. 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* **16**:545-556.
- Lavorel, S., K. Grigulis, P. Lamarque, M. P. Colace, D. Garden, J. Girel, G. Pellet, and R. Douzet. 2011. Using plant functional traits to understand the landscape distribution of multiple ecosystem services. *Journal Of Ecology* **99**:135-147.
- Lavorel, S., S. McIntyre, J. Landsberg, and T. D. A. Forbes. 1997. Plant functional classifications: from general groups to specific groups based on response to disturbance. *Trends In Ecology & Evolution* **12**:474-478.
- Le Roux, X., F. Poly, P. Currey, C. Commeaux, B. Hai, G. W. Nicol, J. I. Prosser, M. Schlöter, E. Attard, and K. Klumpp. 2008. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *Isme Journal* **2**:221-232.
- Leininger, S., T. Urich, M. Schlöter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster, and C. Schleper. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**:806-809.
- Lipson, D. and T. Nasholm. 2001. The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia* **128**:305-316.
- Lipson, D. A., C. W. Schadt, and S. K. Schmidt. 2002. Changes in soil microbial community structure and function in an alpine dry meadow following spring snow melt. *Microbial Ecology* **43**:307-314.

- Lipson, D. A. and S. K. Schmidt. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. *Applied And Environmental Microbiology* **70**:2867-2879.
- Lipson, D. A., S. K. Schmidt, and R. K. Monson. 1999. Links between microbial population dynamics and nitrogen availability in an alpine ecosystem. *Ecology* **80**:1623-1631.
- Lynch, J. M. and J. M. Whipps. 1990. SUBSTRATE FLOW IN THE RHIZOSPHERE. *Plant And Soil* **129**:1-10.
- Maire, V., N. Gross, L. D. S. Pontes, C. Picon-Cochard, and J. F. Soussana. 2009. Trade-off between root nitrogen acquisition and shoot nitrogen utilization across 13 co-occurring pasture grass species. *Functional Ecology* **23**:668-679.
- Malik, T. and H. Smith. 2006. A resource-based model of microbial quiescence. *Journal of Mathematical Biology* **53**:231-252.
- Mancinelli, R. L. 1984. Population-Dynamics Of Alpine Tundra Soil Bacteria, Niwot Ridge, Colorado Front Range, Usa. *Arctic And Alpine Research* **16**:185-192.
- Mason, N. W. H., K. MacGillivray, J. B. Steel, and J. B. Wilson. 2003. An index of functional diversity. *Journal Of Vegetation Science* **14**:571-578.
- McIntyre, S. and S. Lavorel. 2007. A conceptual model of land use effects on the structure and function of herbaceous vegetation. *Agriculture Ecosystems & Environment* **119**:11-21.
- Meharg, A. A. 1994. A CRITICAL-REVIEW OF LABELING TECHNIQUES USED TO QUANTIFY RHIZOSPHERE CARBON-FLOW. *Plant And Soil* **166**:55-62.
- Merbach, W., E. Mirus, G. Knof, R. Remus, S. Ruppel, R. Russow, A. Gransee, and J. Schulze. 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **162**:373-383.
- Milchunas, D. G. and W. K. Lauenroth. 1993. QUANTITATIVE EFFECTS OF GRAZING ON VEGETATION AND SOILS OVER A GLOBAL RANGE OF ENVIRONMENTS. *Ecological Monographs* **63**:327-366.
- Miller, A. E. and W. D. Bowman. 2003. Alpine plants show species-level differences in the uptake of organic and inorganic nitrogen. *Plant And Soil* **250**:283-292.
- Murray, P. J., D. J. Hatch, E. R. Dixon, R. J. Stevens, R. J. Laughlin, and S. C. Jarvis. 2004. Denitrification potential in a grassland subsoil: effect of carbon substrates. *Soil Biology & Biochemistry* **36**:545-547.
- Nesci, A., M. Etcheverry, and N. Magan. 2004. Osmotic and matric potential effects on growth, sugar alcohol and sugar accumulation by *Aspergillus section Flavi* strains from Argentina. *Journal of Applied Microbiology* **96**:965-972.
- Nguyen, C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* **23**:375-396.
- Orwin, K. H., S. M. Buckland, D. Johnson, B. L. Turner, S. Smart, S. Oakley, and R. D. Bardgett. 2010. Linkages of plant traits to soil properties and the functioning of temperate grassland. *Journal Of Ecology* **98**:1074-1083.
- Paterson, E. 2003. Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. *European Journal of Soil Science* **54**:741-750.
- Paterson, E. and A. Sim. 1999. Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. *Plant And Soil* **216**:155-164.
- Patra, A. K., L. Abbadié, A. Clays-Josserand, V. Degrange, S. J. Grayston, N. Guillaumaud, P. Loiseau, F. Louault, S. Mahmood, S. Nazaret, L. Philippot, F. Poly, J. I. Prosser, and X. Le Roux. 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology* **8**:1005-1016.
- Petchey, O. L. and K. J. Gaston. 2006. Functional diversity: back to basics and looking forward. *Ecology Letters* **9**:741-758.
- Pohl, M., R. Stroude, A. Buttler, and C. Rixen. 2011. Functional traits and root morphology of alpine plants. *Annals Of Botany* **108**:537-545.
- Pontes, L. D. S., J. F. Soussana, F. Louault, D. Andueza, and P. Carrere. 2007. Leaf traits affect the above-ground productivity and quality of pasture grasses. *Functional Ecology* **21**:844-853.

- Poorter, H. and R. De Jong. 1999. A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytologist* **143**:163-176.
- Poorter, H. and C. Remkes. 1990. Leaf-Area Ratio And Net Assimilation Rate Of 24 Wild-Species Differing In Relative Growth-Rate. *Oecologia* **83**:553-559.
- Porazinska, D. L., R. D. Bardgett, M. B. Blaauw, H. W. Hunt, A. N. Parsons, T. R. Seastedt, and D. H. Wall. 2003. Relationships at the aboveground-belowground interface: Plants, soil biota, and soil processes. *Ecological Monographs* **73**:377-395.
- Quetier, F., S. Lavorel, W. Thuiller, and I. Davies. 2007. Plant-trait-based modeling assessment of ecosystem-service sensitivity to land-use change. *Ecological Applications* **17**:2377-2386.
- Riedo, M., A. Grub, M. Rosset, and J. Fuhrer. 1998. A pasture simulation model for dry matter production, and fluxes of carbon, nitrogen, water and energy. *Ecological Modelling* **105**:141-183.
- Robinson, D., A. Hodge, B. S. Griffiths, and A. H. Fitter. 1999. Plant root proliferation in nitrogen-rich patches confers competitive advantage. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **266**:431-435.
- Robson, T. M., F. Baptist, J. C. Clement, and S. Lavorel. 2010. Land use in subalpine grasslands affects nitrogen cycling via changes in plant community and soil microbial uptake dynamics. *Journal Of Ecology* **98**:62-73.
- Robson, T. M., S. Lavorel, J. C. Clement, and X. Le Roux. 2007. Neglect of mowing and manuring leads to slower nitrogen cycling in subalpine grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* **39**:930-941.
- Roem, W. J. and F. Berendse. 2000. Soil acidity and nutrient supply ratio as possible factors determining changes in plant species diversity in grassland and heathland communities. *Biological Conservation* **92**:151-161.
- Roumet, C., C. Urcelay, and S. Diaz. 2006. Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytologist* **170**:357-368.
- Saccone, P., S. Morin, F. Baptist, J. M. Bonneville, M. P. Colace, F. Domine, M. Faure, R. Geremia, J. Locket, F. Poly, S. Lavorel, and J. C. Clement. 2013. The effects of snowpack properties and plant strategies on litter decomposition during winter in subalpine meadows. *Plant And Soil* **363**:215-229.
- Sala, O. E., F. S. Chapin, J. J. Armesto, E. Berlow, J. Bloomfield, R. Dirzo, E. Huber-Sanwald, L. F. Huenneke, R. B. Jackson, A. Kinzig, R. Leemans, D. M. Lodge, H. A. Mooney, M. Oesterheld, N. L. Poff, M. T. Sykes, B. H. Walker, M. Walker, and D. H. Wall. 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* **287**:1770-1774.
- Schadt, C. W., A. P. Martin, D. A. Lipson, and S. K. Schmidt. 2003. Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils. *Science* **301**:1359-1361.
- Schimel, J. P. and J. S. Clein. 1996. Microbial response to freeze-thaw cycles in tundra and taiga soils. *Soil Biology & Biochemistry* **28**:1061-1066.
- Schmidt, S. K., E. K. Costello, D. R. Nemergut, C. C. Cleveland, S. C. Reed, M. N. Weintraub, A. F. Meyer, and A. M. Martin. 2007. Biogeochemical consequences of rapid microbial turnover and seasonal succession in soil. *Ecology* **88**:1379-1385.
- Schumacher, J. and C. Roscher. 2009. Differential effects of functional traits on aboveground biomass in semi-natural grasslands. *Oikos* **118**:1659-1668.
- Scott, N. A. and D. Binkley. 1997. Foliage litter quality and annual net N mineralization: Comparison across North American forest sites. *Oecologia* **111**:151-159.
- Senwo, Z. N. and M. A. Tabatabai. 1998. Amino acid composition of soil organic matter. *Biology And Fertility Of Soils* **26**:235-242.
- Sitch, S., B. Smith, I. C. Prentice, A. Arneth, A. Bondeau, W. Cramer, J. O. Kaplan, S. Levis, W. Lucht, M. T. Sykes, K. Thonicke, and S. Venevsky. 2003. Evaluation of ecosystem dynamics, plant geography and terrestrial carbon cycling in the LPJ dynamic global vegetation model. *Global Change Biology* **9**:161-185.

- Stewart, G. B. and A. S. Pullin. 2008. The relative importance of grazing stock type and grazing intensity for conservation of mesotrophic 'old meadow' pasture. *Journal for Nature Conservation* **16**:175-185.
- Sturz, A. V. and B. R. Christie. 2003. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil & Tillage Research* **72**:107-123.
- Tasser, E. and U. Tappeiner. 2002. Impact of land use changes on mountain vegetation. *Applied Vegetation Science* **5**:173-184.
- Tilman, D. 1985. The Resource-Ratio Hypothesis Of Plant Succession. *American Naturalist* **125**:827-852.
- Tilman, D. and D. Wedin. 1991. Dynamics Of Nitrogen Competition Between Successional Grasses. *Ecology* **72**:1038-1049.
- Urcelay, C., M. S. Bret-Harte, S. Diaz, and F. S. Chapin. 2003. Mycorrhizal colonization mediated by species interactions in arctic tundra. *Oecologia* **137**:399-404.
- Vale, M., C. Nguyen, E. Dambrine, and J. L. Dupouey. 2005. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. *Soil Biology & Biochemistry* **37**:2329-2333.
- van der Heijden, M. G. A., R. D. Bardgett, and N. M. van Straalen. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**:296-310.
- van der Heijden, M. G. A., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglou, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken, and I. R. Sanders. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**:69-72.
- van der Heijden, M. G. A., R. Streitwolf-Engel, R. Riedl, S. Siegrist, A. Neudecker, K. Ineichen, T. Boller, A. Wiemken, and I. R. Sanders. 2006. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist* **172**:739-752.
- Van der Krift, T. A. J. and F. Berendse. 2001. The effect of plant species on soil nitrogen mineralization. *Journal Of Ecology* **89**:555-561.
- Van der Krift, T. A. J., P. J. Kuikman, F. Moller, and F. Berendse. 2001. Plant species and nutritional-mediated control over rhizodeposition and root decomposition. *Plant And Soil* **228**:191-200.
- van der Wal, R., H. van Wijnen, S. van Wieren, O. Beucher, and D. Bos. 2000. On facilitation between herbivores: How Brent Geese profit from brown hares. *Ecology* **81**:969-980.
- van Ruijven, J. and F. Berendse. 2005. Diversity-productivity relationships: Initial effects, long-term patterns, and underlying mechanisms. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **102**:695-700.
- VanOorschot, M., E. Robbemont, M. Boerstal, I. VanStrien, and M. VanKerkhoven-Schmitz. 1997. Effects of enhanced nutrient availability on plant and soil nutrient dynamics in two English riverine ecosystems. *Journal Of Ecology* **85**:167-179.
- Verhamme, D. T., J. I. Prosser, and G. W. Nicol. 2011. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *Isme Journal* **5**:1067-1071.
- Viard-Cretat, F., F. Baptist, H. Secher-Fromell, and C. Gallet. 2012. The allelopathic effects of *Festuca paniculata* depend on competition in subalpine grasslands. *Plant Ecology* **213**:1963-1973.
- Viard-Cretat, F., N. Gross, M. P. Colace, and S. Lavorel. 2010. Litter and living plants have contrasting effects on seedling recruitment in subalpine grasslands. *Preslia* **82**:483-496.
- Vile, D., B. Shipley, and E. Garnier. 2006. Ecosystem productivity can be predicted from potential relative growth rate and species abundance. *Ecology Letters* **9**:1061-1067.
- Violle, C., M. L. Navas, D. Vile, E. Kazakou, C. Fortunel, I. Hummel, and E. Garnier. 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* **116**:882-892.
- Vitousek, P. M., J. D. Aber, R. W. Howarth, G. E. Likens, P. A. Matson, D. W. Schindler, W. H. Schlesinger, and D. Tilman. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications* **7**:737-750.

- Vittoz, P., P. Selldorf, S. Eggenberg, and S. Maire. 2005. *Festuca paniculata* meadows in Ticino (Switzerland) and their Alpine environment. *Botanica Helvetica* **115**:33-48.
- Wardle, D. A. 1992. A COMPARATIVE-ASSESSMENT OF FACTORS WHICH INFLUENCE MICROBIAL BIOMASS CARBON AND NITROGEN LEVELS IN SOIL. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **67**:321-358.
- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. van der Putten, and D. H. Wall. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**:1629-1633.
- Wardle, D. A., G. M. Barker, K. I. Bonner, and K. S. Nicholson. 1998. Can comparative approaches based on plant ecophysiological traits predict the nature of biotic interactions and individual plant species effects in ecosystems? *Journal Of Ecology* **86**:405-420.
- Wedin, D. A. and D. Tilman. 1990. Species Effects On Nitrogen Cycling - A Test With Perennial Grasses. *Oecologia* **84**:433-441.
- Westoby, M. 1998. A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant And Soil* **199**:213-227.
- Wright, I. J., P. B. Reich, M. Westoby, D. D. Ackerly, Z. Baruch, F. Bongers, J. Cavender-Bares, T. Chapin, J. H. C. Cornelissen, M. Diemer, J. Flexas, E. Garnier, P. K. Groom, J. Gulias, K. Hikosaka, B. B. Lamont, T. Lee, W. Lee, C. Lusk, J. J. Midgley, M. L. Navas, U. Niinemets, J. Oleksyn, N. Osada, H. Poorter, P. Poot, L. Prior, V. I. Pyankov, C. Roumet, S. C. Thomas, M. G. Tjoelker, E. J. Veneklaas, and R. Villar. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* **428**:821-827.
- Xu, X. L., C. F. Stange, A. Richter, W. Wanek, and Y. Kuzyakov. 2008. Light affects competition for inorganic and organic nitrogen between maize and rhizosphere microorganisms. *Plant And Soil* **304**:59-72.
- Zeller, V., R. D. Bardgett, and U. Tappeiner. 2001. Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. *Soil Biology & Biochemistry* **33**:639-649.

Chapitre 2

Expérimentations & méthodes

Au cours de ma thèse, plusieurs types d'expérimentations ont été mises en place pour réduire graduellement les conditions de contrôle des paramètres environnementaux. Les différentes modalités seront détaillées dans les chapitres correspondants. Dans cette partie seront présentées les mesures communes ainsi que ma contribution aux diverses expérimentations et analyses de données.

Sites, sols et fertilisations

- Expérimentations en pots

Les expérimentations en conditions contrôlées permettent de réaliser une approche par étape des relations plantes-microorganismes en limitant ou contrôlant les facteurs abiotiques susceptibles d'influencer ces relations (Fig. 11). Elles permettent notamment d'avoir une approche mécaniste fine de ces interactions avec des techniques difficiles à mettre en œuvre sur le terrain. C'est le cas des deux expérimentations présentées ici puisque dans la première, le sol a été stérilisé et dans la seconde, un marquage isotopique continu au ^{13}C a été réalisé pendant deux mois. Cependant, ce type de dispositif présente certains inconvénients. Les expérimentations doivent être réalisées sur un pas de temps limité, en raison du coût de ce type d'expérimentation, et de la taille des pots qui limite la croissance des individus végétaux entraînant un biais sur les mesures de traits et notamment les traits racinaires. De par cette limite de temps, les processus mesurés sont sensiblement biaisés car les plantes souffrent de la réimplantation et leurs effets sur les communautés microbiennes sont moindres que ceux pouvant se développer sur une plus longue période.

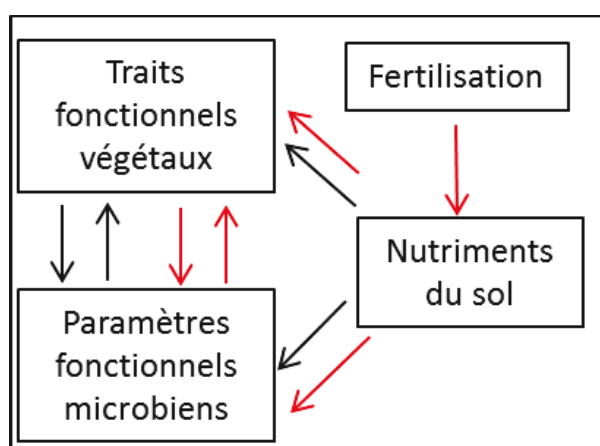


Figure 11. Représentation schématique des relations étudiées avec les expérimentations contrôlées. Seuls les effets de la fertilisation et de la gamme de traits fonctionnels végétaux (d'individu d'espèces avec stratégies d'acquisition des ressources contrastées) sur les paramètres fonctionnels microbiens sont analysés. Les couleurs de flèches symbolisent les deux conditions de disponibilité de l'azote mise en place en conditions contrôlées (sans (noires) ou avec ajout d'azote (rouges)).

Ces expérimentations se sont déroulées sous serres au laboratoire EVA (UMR INRA/Univ. Caen) ou dans des chambres de croissance au département de biologie végétale de l'Université de Barcelone.

L'expérimentation au laboratoire EVA avait pour objectif de déterminer l'influence de la fertilisation et des traits fonctionnels végétaux de trois espèces de graminées dominantes des prairies du Lautaret (*Dactylis glomerata*, *Bromus erectus* et *Festuca paniculata*) sur la nitrification et la dénitrification, la présence et le taux de mycorhization. Chacune des espèces a été cultivée sous serre pendant 3 mois (Fig. 12). Le sol utilisé est celui des prairies de pentes non fauchées du Lautaret (texture : 23% sable, 47% limons et 30% argiles) auquel de la vermiculite a été ajoutée (vermiculite : sol ; 1:5) afin de faciliter la récupération des racines lors de la récolte. La stérilisation a été réalisée sur le sol sec, avant mélange avec la vermiculite et ré-humectation, en le soumettant à des rayons gamma. Les sols ont été fertilisés (éq. 100 kg N. ha⁻¹.an⁻¹) avec un engrais à libération lente sous forme d'Osmocote (NPK 20 10 10), et tous les sols ont été amendés avec une solution nutritive contenant tous les autres éléments essentiels. Au total, l'étude comprenait 48 pots: 3 espèces x 4 réplicats x 2 types de fertilisation x 2 types de substrats (sol stérilisé ou non).



Figure 12. Expérimentation en pots dans le laboratoire EVA et détail de l'intérieur d'un pot avant récolte.

Lors de cette expérimentation, j'ai contribué à la création et à la mise en place du dispositif expérimental. J'ai réalisé l'homogénéisation du sol et l'implantation des individus. Le suivi et

l'entretien des plantes ont été réalisés par E. Personeni (UMR EVA, Caen). J'ai participé à la récolte des pots et à la mesure des traits aériens et racinaires, puis j'ai effectué toutes les analyses physico-chimiques du sol. Les analyses d'activités microbiennes ont été réalisées à Lyon par l'équipe de F. Poly (LEM-Lyon), les analyses des mycorhizes par M-N Binet et B. Mouhamadou (LECA). Enfin, j'ai réalisé l'ensemble des analyses et des statistiques sur le jeu de données de l'article du chapitre 3.

L'expérimentation réalisée par Florence Baptist, postdoctorante à Barcelone, avait pour objectif de déterminer l'influence de la fertilisation et des traits fonctionnels végétaux de trois espèces variant par leurs stratégies d'acquisition et d'utilisation des nutriments (*Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *Briza media* et *Anthoxanthum odoratum*) sur la rhizodéposition de ces espèces et la biomasse microbienne du sol. Chacune des espèces a été cultivée en chambre de croissance dans une atmosphère marquée au ^{13}C pendant 79 jours (Fig. 13).



Figure 13. Expérimentation de rhizodéposition dans le département de biologie végétale de l'Université de Barcelone. Photographie d'une chambre de croissance contenant des pots des 4 espèces et du sol nu (F. Baptist).

Des pots sans plantes ont été mis en place pour servir de contrôle de l'assimilation des rhizodépôts par les microbes. Le sol utilisé est un sol sableux (82% sable, 10% limons et 8% argiles) provenant de la station expérimentale de l'Université de Munich à Scheyern en Allemagne. Les sols ont été fertilisés avec une solution contenant ou non de l'N minéral (équ. $100 \text{ kg N. ha}^{-1}.\text{an}^{-1}$) et tous les autres éléments nutritifs essentiels en deux applications. Au total, l'étude comprenait 80 pots: 4 espèces (+ 1 sol nu) x 4 réplicats x 2 types de fertilisation x 2 récoltes (7 jours avant la récolte finale (t_i) et récolte finale (t_f)).

Je n'ai pas contribué à la mise en place ni à la récolte des données de cette expérimentation entièrement assurée par F. Baptist et l'équipe de recherche de Barcelone. Cependant, suite au changement de carrière de F. Baptist, **j'ai pris le relai sur l'analyse de données et l'écriture**

de l'article. N'étant pas majoritairement de mon fait, l'article en cours de préparation de cette expérimentation sera présenté en annexe du chapitre 2.

- Expérimentation en mésocosmes

L'expérimentation en conditions semi-contrôlées a été réalisée *via* la mise en place de mésocosmes qui sont des « écosystèmes » artificielles permettant de contrôler les paramètres du milieu (Fig. 14). Ils se différencient des expérimentations en pots sous serre car les mésocosmes sont utilisés généralement *in situ* et donc permettent une étude selon les conditions abiotiques locales (notamment climatiques). En écologie végétale, ces dispositifs ont souvent été utilisés pour tester l'effet de la biodiversité en manipulant artificiellement le nombre et la distribution des espèces tout en maintenant une densité constante (Hooper *et al.*, 2005). Dans le cadre de notre objectif d'étudier l'effet des traits fonctionnels végétaux, cette approche est la suite logique aux expérimentations en situations contrôlées présentées précédemment. En effet, tout en conservant un sol homogène entre les différents traitements, nous avons manipulé la distribution de quatre espèces herbacées différant par leurs traits fonctionnels afin de créer un gradient de traits fonctionnels. Ce dispositif présente l'avantage de faire des expérimentations sur des pas de temps plus longs et laisse le temps aux plantes de se « remettre » du stress de la réimplantation et d'influencer par la suite les processus écosystémiques. L'inconvénient majeur de ce dispositif est qu'une fois mis en place, il n'est pas possible de contrôler le développement de chacune des espèces au sein de la communauté artificielle biaisant ainsi le gradient de traits théorique espéré.

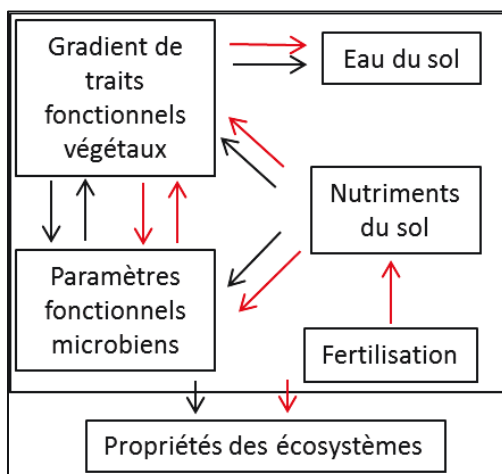


Figure 13. Représentation schématique des relations étudiées avec les expérimentations contrôlées. Seuls les effets de la fertilisation et de la gamme de traits fonctionnels végétaux (d'individu d'espèces avec stratégies d'acquisition des ressources contrastées) sur les paramètres fonctionnels microbiens sont analysés. Les couleurs de flèches symbolisent les deux conditions de disponibilité de l'azote mise en place en conditions contrôlées (sans (noires) ou avec ajout d'azote (rouges)).

Cette expérimentation s'est déroulée sur la parcelle expérimentale de la Station Alpine Joseph Fourier (SAJF, UMS CNRS/UJF 3370; Fig. 14). Cette expérimentation avait pour objectif de

déterminer les relations entre les traits fonctionnels végétaux et la diversité fonctionnelle microbienne en lien avec le cycle de l’N, et leurs impacts sur les processus écosystémiques. Un gradient de traits fonctionnels végétaux moyens des communautés a été créé en manipulant l’abondance de quatre espèces dans des communautés végétales artificielles cultivées dans des mésocosmes (45-cm de diamètre, 40-cm de profondeur).

Deux espèces monocotylédones, une exploitatrice (*Dactylis glomerata*) et une conservatrice (*Festuca paniculata*), et deux espèces dicotylédones, une exploitatrice (*Geranium sylvaticum*) et une conservatrice (*Achillea millefolium*) ont été choisies.



Figure 14. Communautés végétales artificielles en mésocosmes sur la parcelle expérimentale de la SAJF au Col du Lautaret

Tous les schémas de plantation respectaient les proportions naturelles retrouvées au champ sur le site du Lautaret, soit 60 à 80% de monocotylédones et 20 à 40% de dicotylédones. Au total, huit communautés artificielles dont les proportions de chaque espèce (les proportions des traits fonctionnels) variaient ont été mises en place (Fig. 15) et cultivées pendant deux saisons de végétation. Pour ce dispositif en mésocosme, nous avons utilisé le même sol que pour l’expérimentation sous serre à Caen mais sans mélange avec de la vermiculite. Le fertilisant a été apporté une fois par an sur les deux saisons de culture avec un engrais à libération lente sous forme d’Osmocote (NPK 20 10 10).

exploitative		conservative		nb. de plantes par mesocosme	
<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Geranium sylvaticum</i>	<i>Festuca paniculata</i>	<i>Achillea millefolium</i>		
10	3	14	9	36	A
14	9	10	3	36	B
24	4	6	2	36	C
20	9	4	3	36	D
18	4	12	2	36	E
4	3	20	9	36	F
6	2	24	4	36	G
12	2	18	4	36	H

Figure 15 : Proportion de chaque espèce dans chacun des huit traitements mis en place au jardin alpin

Au total, l'étude comprenait 64 mésocosmes : 8 traitements x 4 réplicats x 2 niveaux de fertilisation.

Sur cette expérimentation, j'ai contribué à la mise en place du dispositif expérimental et à l'implantation des individus. J'ai réalisé l'entretien des communautés, la mise en place des traitements de fertilisation et la fauche de la première année. J'ai encadré l'équipe d'une dizaine de personne (équipe FYSE-LECA, équipe du LEM-Lyon et stagiaires) lors de la récolte des pots et de la mesure des traits aériens. J'ai assuré la mesure des traits racinaires (avec l'aide de J. Bonnefoy, EVA-Caen) et les analyses physico-chimique du sol. Les analyses d'activités microbiennes ont été réalisées à Lyon par l'équipe de F. Poly, les analyses des mycorhizes par M-N Binet et B. Mouhamadou (LECA), les extractions et analyses ADN des communautés microbiennes du cycle de l'N par l'équipe de F. Poly (LEM, Lyon), et E. Kastl (HELM, Munich), et les analyses PLFA par C. Baxendale (Université de Lancaster). Enfin, j'ai réalisé l'ensemble des analyses et des statistiques sur le jeu de données de l'article du chapitre 4.

Après deux ans de croissance, *A. millefolium* s'est développée de manière beaucoup plus importante que prévu en participant à près de 80% à la biomasse de la communauté dans certains mésocosmes. Les analyses préliminaires sur le jeu de données menées par Iris Bumb, stagiaire de master 2 que j'ai encadré en 2011, ont montré que ce développement d'*A. millefolium* ne nous a pas permis d'obtenir le gradient de traits fonctionnels attendus. De plus, ce développement n'étant pas homogène dans chacun des traitements, nous avons observé une variation intra-traitement supérieure à la variation inter-traitement. Ce résultat nous a donc obligé à raisonner à l'échelle du mésocosme et non à celle du traitement. Les résultats nous ont également montré que les traits fonctionnels de chacune des espèces ne variaient pas et avons décidé de négliger la variation intra-spécifique.

- Expérimentations au champ

Les analyses en conditions contrôlées permettent d'identifier les mécanismes impliqués dans les relations plantes-microorganismes et leurs contributions aux fonctionnements de l'écosystème. Cependant, les variations des propriétés du facteur majeur influençant les communautés végétales et microbiennes qu'est le sol n'ont pas été prises en compte. Des mesures au champ permettent d'identifier lesquelles des propriétés du sol, autres que la teneur en nutriments que nous faisons varier en conditions contrôlées, influencent les relations plantes-microorganismes et les processus écosystémiques. Afin d'intégrer la variable "sol", nous avons réalisé des mesures sur une gamme de prairies permettant d'obtenir un gradient de traits fonctionnels végétaux et de paramètres fonctionnels microbiens (Fig. 16).

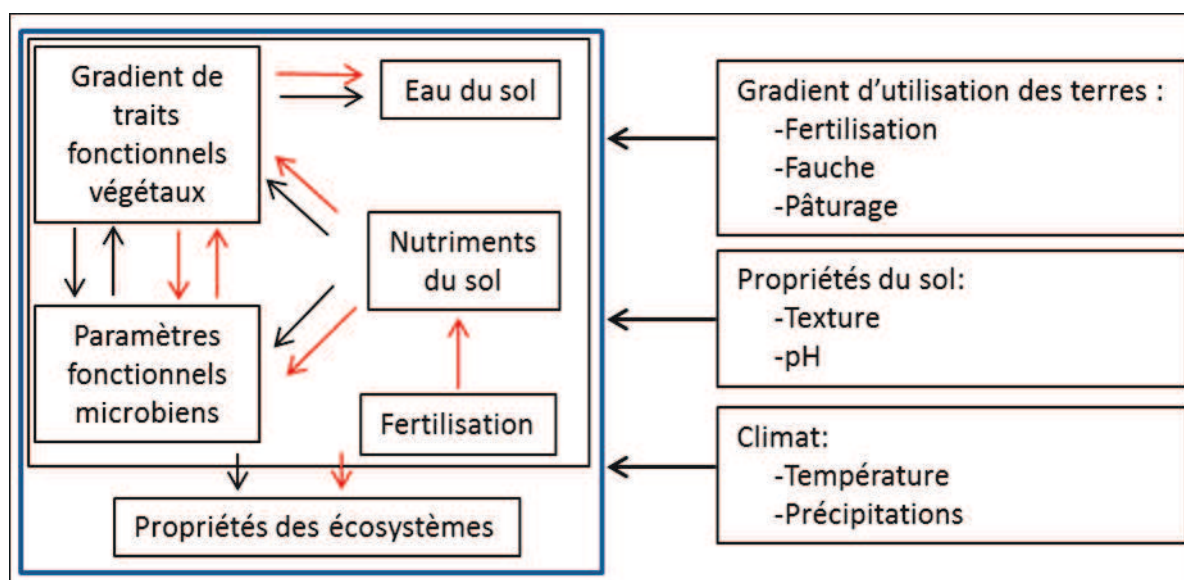


Figure 16. Représentation schématique montrant, au champ, quels sont les facteurs qui influencent les processus étudiés en conditions contrôlées. Les couleurs de flèches symbolisent les deux conditions de disponibilité de l'azote mise en place en conditions contrôlées (sans (noires) ou avec ajout d'azote (rouges)).

Cependant, comme avec les mésocosmes, certains paramètres importants du sol comme la disponibilité en nutriments varient fortement et conduisent à des variations intra-traitements supérieures aux inter-traitements, nous obligeant là encore à réaliser une étude à l'échelle du point d'échantillonnage (plot) plutôt qu'à celui du traitement (type de prairie). De plus, certains aléas biotiques tels que l'invasion par les campagnols, l'élimination des marquages par les animaux domestiques ou par les touristes entraînent une perte de données sur certaines variables qui doivent ensuite être écartées (sac de litière ou de résine notamment).

Pour les expérimentations *in situ*, les cinq types de prairies décrites en introduction ont été sélectionnés en triplicat, chaque prairie correspondant à une utilisation des terres (Fig. 17).

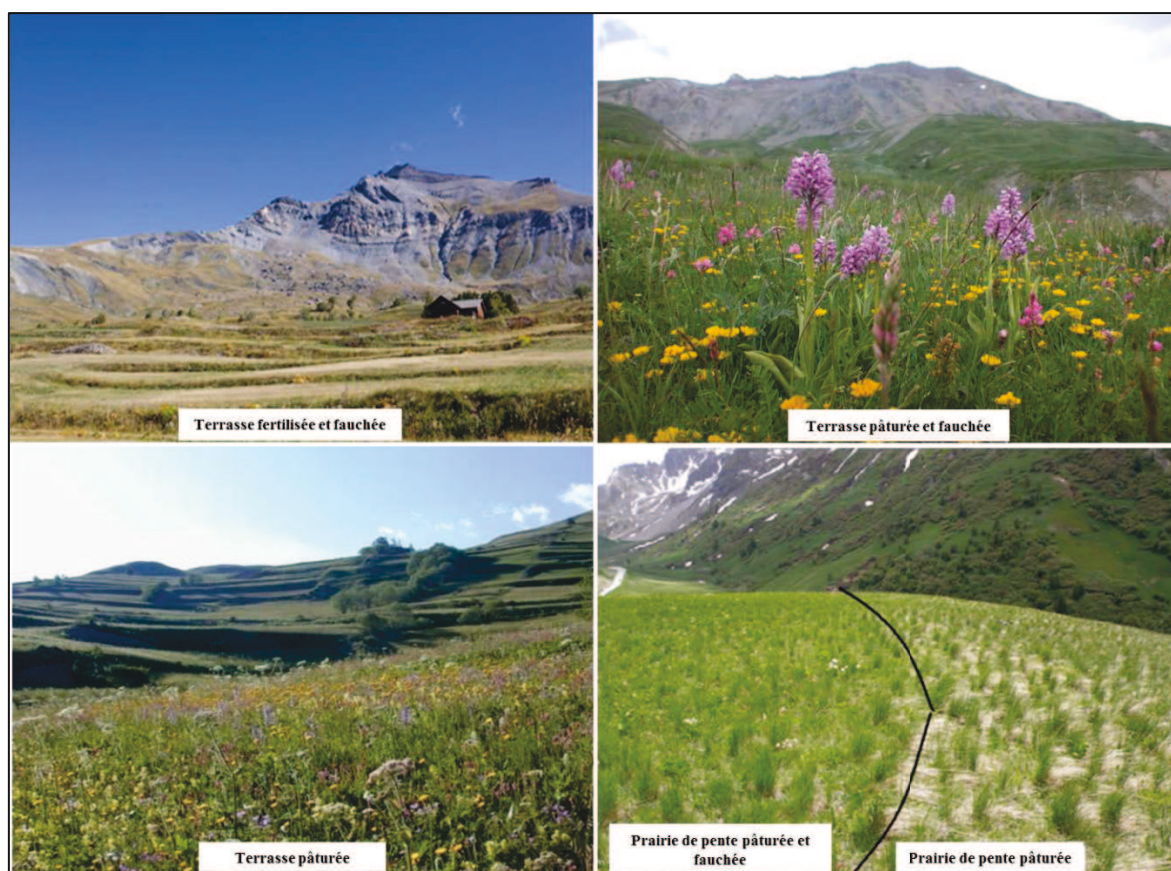


Figure 17. Les différentes prairies étudiées au cours de mes travaux de thèse.

Pour faire le lien avec les articles scientifiques qui suivent, les prairies seront dénommées de la même façon à savoir :

- les prairies terrassées, fertilisées et fauchées : FMT (Fertilised and Mown Terraced)
- les prairies terrassées, fauchées et pâturées : MT (Mown Terraces)
- les prairies terrassées et pâturées : UT (Unmown Terraces)
- les prairies de pentes fauchées et pâturées : MU (Mown Unterraced grasslands)
- les prairies de pentes pâturées : MU (Unmown Unterraced grasslands)

Une première expérimentation sur 4 de ces trajectoires a été mis en place à la fonte des neiges (Mai 2010) afin d'évaluer l'effet du changement d'utilisation des terres sur l'absorption de l'N inorganique par les communautés végétales et microbiennes. En comparant ces données à une précédente étude réalisée sur les mêmes trajectoires mais au pic de végétation (Robson *et al.*, 2010), l'influence de la saison a pu également être abordée. Sur chacune d'elles, 3x3 blocs

ont été délimités puis marqués au $^{15}\text{N-NO}_3$ et $^{15}\text{N-NH}_4$. Les échantillons ont été récoltés avant marquage puis 2 jours et 1 semaine après pour suivre les flux d'N inorganique entre les communautés végétales et microbiennes (Fig. 18).



Figures 18. Marquage au ^{15}N sur une terrasse fauchée et zone marquée après les deux temps de récolte.

Au total, 108 récoltes ont été réalisées : 4 sites x 3 parcelles x 3 réplicats par parcelle x 3 récoltes (contrôle, 2 jours et 7 jours après marquage).

Ma contribution sur cette expérimentation a été totale puisque j'ai réalisé la mise en place du dispositif, l'ensemble des mesures et des l'analyses de données présentées dans l'article Legay *et al.* (soumis) du chapitre 6.

Dans ce même contexte de variations saisonnières et d'utilisations des terres différentes, une seconde expérimentation, dirigée par F. Grassein, avait pour objectif d'évaluer les capacités d'absorption de l'N inorganique chez trois espèces avec des utilisations contrastées des ressources, à savoir *Festuca paniculata*, *Bromus erectus* et *Dactylis glomerata*. Sur quatre des trajectoires décrites et à trois périodes au cours de la saison de végétation (fin de la fonte des neiges, pic de biomasse, et en automne), trois individus de chaque espèce ont été prélevés. Les capacités d'absorption de l'N de chacune des espèces (mesure ex-situ sur des racines excisées) et les traits fonctionnels végétaux ont été mesurés sur chacun de ces individus. Le principe de la mesure des capacité d'absorption sur des racines excisées étant entièrement détaillé dans l'article du chapitre 6, il ne sera pas de nouveau décrit.

Sur cette expérimentation, j'ai participé à l'échantillonnage des plantes et aux mesures de traits fonctionnels. J'ai réalisé l'ensemble des analyses physico-chimiques du sol et participé à la rédaction de l'article Grassein *et al.* (soumis à Journal of Ecology).

Pour l'expérimentation sur les liens entre traits fonctionnels végétaux qui s'est déroulée lors du pic de biomasse, 3 blocs (10 x 10 m) sur 3 parcelles ont été délimités et protégés avec des clôtures sur chacun des 3 types de prairies (trajectoires) étudiés (Fig. 19). La détermination des espèces contribuant à 80% de la biomasse aérienne de la prairie a été réalisée avec la méthode Botanal (voir ci-après) et la mesure des traits fonctionnels végétaux a été faite selon Cornelissen *et al.* (2003). Dans chacun des blocs, la végétation a été fauchée dans 4 quadrats (50x50 cm) pour la mesure de la digestibilité et pour le prélèvement des échantillons de sol en vue des analyses physico-chimiques et microbiennes. Au total, 36 échantillonnages ont été effectués : 3 types de prairies x 3 parcelles x 4 quadrats.



Figure 19. Mise en place de filets de protection sur les prairies de pentes non fauchées et photographie d'un quadrat après la campagne d'échantillonnage.

J'ai contribué à la mise en au point du protocole de mesure commun aux 3 sites du projet VITAL. J'ai participé à la campagne d'estimation BOTANAL et de mesures de traits aériens. J'ai encadré l'équipe d'une dizaine de personne (équipe FYSE, équipe du LEM de Lyon et stagiaires) lors de l'échantillonnage des carottes de sol et de racines. J'ai réalisé la mesure des traits racinaires, de digestibilité, les analyses physico-chimiques du sol, l'installation des sacs de litière et de résines échangeuses d'ions. Les analyses d'activités microbiennes ont été

réalisées à Lyon par l'équipe de F. Poly (LEM), les analyses des mycorhizes par M-N Binet et B. Mouhamadou (LECA), les extractions et analyses ADN des communautés microbiennes du cycle de l'N par l'équipe de F. Poly (LEM), et E. Kastl (HELM, Munich), et les analyses PLFA par C. Baxendale à l'Université de Lancaster. J'ai contribué à la fourniture de données et aux analyses préliminaires de l'article Grigulis *et al.* (2013), et j'ai réalisé l'ensemble des analyses et des statistiques sur le jeu de données de l'article Legay *et al.* (soumis) du chapitre 5.

Les traits fonctionnels végétaux

- Mesure des traits fonctionnels foliaires

Les protocoles standards décrits par Cornelissen *et al.* (2003) que j'ai utilisé, seul ou en collaboration, permettent la comparaison de nos résultats avec la littérature et avec les résultats acquis sur les deux autres sites européens du projet VITAL.

- Mesure des traits fonctionnels racinaires

Cornelissen *et al.* (2003) ne traitent que des traits aériens, un protocole commun a donc été établi pour le projet VITAL pour mesurer les traits fonctionnels racinaires. Les traits racinaires sont analysés soit sur l'ensemble du système racinaire des plantes lorsque l'on peut le prélever entièrement (expérimentations en pots), soit sur des aliquotes. Dans le second cas, une carotte de sol de volume connu, est prélevée, pesée, lavée à l'eau distillée, et tamisée séquentiellement (5.6, 2 et 0.5-mm) pour séparer les racines du sol. Les racines sont pesées, conservées dans une solution (acide acétique 5% et éthanol 10% v:v) jusqu'à mesure de la morphologie et/ou du taux de mycorhization. Pour la mesure de la morphologie racinaire, les racines sont mises en suspension dans 1-cm d'eau puis scannées à 300 dpi (Epson Expression 10000XL). Chaque image est analysée avec WHINRHIZO (Regent Instruments Inc., Canada) pour déterminer la longueur et le diamètre moyen des racines. Les échantillons sont séchés à 60°C pendant une semaine pour déterminer la longueur spécifique racinaire (SRL = longueur (m) / masse sèche (g)). Les quantités de C et d'N totales sont déterminées avec un analyseur élémentaire (FlashEA 1112, Thermo Electron Corporation). Réalisé par moi pour la majeure partie des mesures.

- Calcul des traits moyens au niveau de la communauté

Contrairement aux mesures des traits racinaires qui sont réalisées directement à l'échelle de la communauté *via* les carottes de sol, les mesures de traits foliaires le sont au niveau de l'individu. Pour obtenir un trait moyen de la communauté végétale (Grime, 1998), il faut identifier toutes les espèces couvrant au total 80% de l'abondance de la communauté, et mesurer leurs traits. L'abondance relative des espèces est quantifiée à l'aide d'une méthode combinant une estimation visuelle, la méthode Botanal (Tothill *et al.*, 1978) avec celle, plus classique, basée sur la contribution en poids secs de chaque espèce à la biomasse totale de la communauté végétale. Ainsi, une estimation visuelle de la biomasse végétale est faite par un observateur dont de précédentes observations ont été calibrées sur 10-20 parcelles récoltées, séchées puis pesées. Dans chaque parcelle, les 3 espèces végétales les plus abondantes sont classées en fonction de leurs biomasses par consensus avec d'autres observateurs (2-5). Enfin, un système de pondération standard est utilisé pour estimer la biomasse de chaque espèce (Jones & Hargreaves, 1979). Avec cette méthode, on sélectionne ainsi pour le Lautaret entre 5 et 10 espèces par parcelle sur lesquelles les traits foliaires seront mesurés (Fig 20). Réalisé par moi et certains collaborateurs.



Figure 20. Mesure de la hauteur végétative au cours de la campagne d'estimation Botanal.

Analyses physico-chimiques du sol

- Les analyses de routine

Lors de toutes ces expérimentations, le sol frais récolté est pesé, tamisé à 5.6-mm pour limiter les flushs d’N liés à la rupture des agrégats du sol (Jones & Willett, 2006), puis stocké à 4°C jusqu’à détermination de l’humidité du sol, du pH, de la teneur en matière organique et des quantités de C et d’N totales. La plupart de ces analyses ont été réalisées par moi en m’appuyant sur la plateforme d’analyses environnementales du LECA.

La teneur en eau du sol (SWC=Soil Water Content) est déterminée par séchage à 70°C pendant une semaine, et est suivi par une perte au feu (4h à 550°C) pour calculer la teneur en matière organique du sol (SOM).

$$\text{SWC (en g.g}^{-1}\text{)} = [(\text{poids frais (g)} - \text{poids sec (g) à } 70^{\circ}\text{C}) / \text{poids sec (g) à } 70^{\circ}\text{C}]$$

$$\text{SOM (en \%)} = [(\text{poids sec (g) à } 70^{\circ}\text{C} - \text{poids sec (g) à } 105^{\circ}\text{C}) / \text{poids sec (g) à } 70^{\circ}\text{C}] \times 100$$

Les mesures de C et d’N totaux ainsi que de pH sont réalisées sur des sous-échantillons de sol séchés à l’air. Le pH est mesuré sur un mélange sol-eau distillée (1:4, v:v). Les teneurs en C et en N sont analysées avec un analyseur élémentaire (FlashEA 1112, Thermo Electron Corporation) à partir d’échantillons de sols broyés.

Les propriétés de rétention de l’eau et des nutriments du sol ainsi que sa densité sont déterminées à l’aide de bloc de sol intact. Pour cela, sur une surface où la végétation a été rasée, un bloc de sol d’un volume connu (généralement 205 cm³) est prélevé et pesé. 100-ml d’eau distillée sont versés pour saturer le sol, l’excédent d’eau va s’égoutter dans une éprouvette. Le sol saturé est pesé, puis séché pour enfin calculer le poids sec, la capacité au champ, la quantité d’eau gravimétrique et volumique, la porosité totale, la porosité accessible à l’eau, et la densité (Robertson *et al.*, 1999). L’eau récupérée est analysée pour déterminer les concentrations et les quantités de NO₃⁻ et NH₄⁺ perdues par lessivage (voir paragraphe suivant).

$$\text{Densité du sol (g.cm}^{-3}\text{)} = \text{poids sec de sol (g)} / \text{volume du bloc (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Eau gravimétrique (g.g}^{-1} \text{ de sol sec)} = (\text{poids frais de sol (g)} - \text{poids sec de sol (g)}) / \text{poids de sol sec (g)}$$

$$\text{Eau volumétrique (mL.cm}^{-3} \text{ de sol)} = \text{eau gravimétrique (g.g}^{-1} \text{ de sol sec)} \times \text{densité du sol (g.cm}^{-3})$$

$$\text{Capacité au champ (\%)} = ((\text{masse d'eau du sol saturé (g)} - \text{poids sol saturée en eau (g)}) / \text{masse d'eau du sol saturé (g)}) \times 100$$

$$\text{Porosité du sol (\%)} = 1 - [(\text{densité du sol (g.cm}^{-3}) / 2.65) \times 100]$$

$$\text{Porosité accessible à l'eau (\%)} = [\text{SWC (g.g}^{-1}) \times (\text{densité du sol (g.cm}^{-3}) / \text{porosité du sol (\%)})] \times 100$$

- L'azote

Les différentes formes d'N du sol (formes inorganiques = ammonium (NH_4^+ -N), nitrate (NO_3^- -N), azote total dissout (TDN=Total Dissolved Nitrogen), et azote organique dissout (DON=Dissolved Organic Nitrogen)) sont extraites sur sol frais agité pendant 1 heure dans une solution à 0.5M de K_2SO_4^- . Les concentrations sont mesurées sur chaîne colorimétrique FS-IV (OI-Analytical Corp., TX, USA) selon Robertson *et al.* (1999). Les quantités de N-NO_3^- et N-NH_4^+ perdues par le sol dans l'eau de lessivage sont également mesurées par colorimétrie.

La disponibilité en N du sol est estimée à l'aide de sacs en nylon (10×5 cm) remplis avec 5g de résine échangeuse d'ions (Amberlite IRN150, VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France) et insérés dans le sol (10-cm de profondeur à 45°) pendant 6 semaines. Les N-NO_3^- et N-NH_4^+ capturés par les résines sont relâchés par extraction au KCl (1M) puis analysés sur chaîne colorimétrique.

La minéralisation potentielle de l'N (NMP = Nitrogen Mineralization Potential) a été mesurée pour certaines expérimentations. Le taux de NMP est déterminé par incubation anaérobie de sol frais (7 jours au noir à 40°C), l'N organique est minéralisé et s'accumule sous forme de NH_4^+ (Waring & Bremner, 1964 ; Wienhold, 2007). La différence de concentration en ions ammonium avant (t_1) et après l'incubation (t_2) permet de calculer le taux de minéralisation potentielle.

$$\text{NMP } (\mu\text{g N. g}^{-1} \text{ sol sec. jour}^{-1}) = ((\text{N-NH}_4^+)_{t_1} - (\text{N-NH}_4^+)_{t_2}) / 7 \text{ jours} / \text{poids secs de sol (g)}$$

L’N contenu dans la biomasse microbienne a été mesuré par fumigation-extraction au chloroforme selon Vance *et al.* (1987). Du sol frais est incubé pendant 7 jours, au noir et à température ambiante dans une atmosphère saturée en chloroforme afin de lyser les cellules microbiennes qui vont relarguer leur contenu cellulaire dont l’N. Ce sol fumigé et un échantillon de sol contrôle non fumigé sont extraits au K_2SO_4 (0.5M). Ces solutions sont ensuite oxydées au persulfate de potassium à 120°C pour transformer les formes dissoutes de l’N en NO_3^- (Ameel *et al.*, 1993). La mesure par colorimétrie de la concentration de NO_3^- avant et après fumigation permet d’évaluer la quantité d’N relâchée par le pool microbien. A partir de cette quantité, il est possible de déterminer la biomasse microbienne selon la procédure décrite par Robertson *et al.* (1999).

$$\begin{aligned} &\text{Biomasse microbienne } (\mu\text{g.g}^{-1} \text{ de sol sec}) \\ &= ([\text{N-NO}_3^- \mu\text{gN.g}^{-1} \text{ de sol sec}] \text{ après fumigation} - [\text{N-NO}_3^- \mu\text{gN.g}^{-1} \text{ de sol sec}] \text{ avant} \\ &\text{fumigation}) \times 0.38. \end{aligned}$$

Analyses microbiennes

Au cours de ma thèse, les paramètres fonctionnels microbiens ont été mesurés par les collaborateurs du projet VITAL (F. Poly, T. Pommier, M. Dumont et A. Cantarel du LEM-Lyon, M. Schlöter et E. Kastl du HELM-Munich, R.D. Bardgett et C. Baxendale-Université de Lancaster). Ces analyses méritent d’être décrites ici de manière plus détaillée que dans les articles.

- Composition globale des communautés microbiennes

La composition de la communauté microbienne est obtenue par analyse des profils d’acides gras phospholipidiques (PLFA) du sol qui sont caractéristiques des communautés microbiennes (Bardgett *et al.*, 1996). Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme de l’Université de Lancaster. Les lipides sont extraits du sol avec une solution chloroforme-méthanol - tampon citrate, puis digérés au persulfate pour casser les liaisons phosphates des lipides (Frostegard *et al.*, 1991). Les acides gras sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Hewlett-Packard 5890 II) équipé d’un détecteur sélectif des masses (5972A MSD II) pour fractionner puis mesurer l’abondance des phospholipides microbiens. Les acides gras

i150:0, a150:0, 15:0, i16:0, 17:0, i17:0, cy17:0, cis18:1 ω 7 and cy19:0 sont choisis comme représentatifs des acides gras bactériens et le 18:2 ω 6 comme celui des acides gras fongiques (Bardgett & McAlister, 1999). Cette méthode permet de quantifier **la proportion de champignons et de bactéries dans le sol**, la quantité totale de PLFA est utilisée comme une mesure de la **biomasse microbienne active**.

- Analyse du taux de colonisation racinaire par les mycorhizes arbusculaires

Le taux de mycorhization est déterminé sur des racines lavées puis colorées au bleu trypan après rinçage à l'hydroxyde de potassium (Phillips & Hayman, 1970). Les paramètres de colonisation mycorhizienne sont estimés par microscopie optique (Trouvelot *et al.*, 1986), et ont été réalisés par M-N Binet (LECA). Deux paramètres de développement mycorhizien sont calculés à l'aide du programme MycoCalc (<http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>) :

- Fréquence des mycorhizes sur le système racinaire (F%),
- Intensité de la colonisation mycorhizienne sur le système racinaire (M%).

- Abondance des gènes microbiens liés au cycle de l'azote

L'abondance de gènes des communautés microbiennes nitrifiantes et dénitrifiantes a été mesurée par le LEM (Lyon) pour les gènes des bactéries nitrifiantes (*Nitrobacter* et *Nitrospira*) et dénitrifiantes, et par le HELM (Munich) pour les gènes des bactéries nitrifiantes (*amoA*-AOA et *amoA*-AOB).

L'ADN du sol est extrait à partir de 0.5-g de sol frais à l'aide de kits d'extraction (FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) ; Precellys24 Instrument (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France)). La quantité et la qualité de l'ADN sont ensuite testées par spectrophotométrie (Nanodrop; PeqLab, Erlangen, Allemagne). L'extraction est suivie d'une PCR quantitative en temps réel en utilisant le vert SYBR comme colorant fluorescent. L'abondance des différentes communautés nitrifiantes est mesurée par quantification du nombre de copie des gènes de l'ammonium oxygénase *amoA* pour les bactéries (*amoA*-AOB) et les archées (*amoA*-AOA) qui oxydent le NH_4^+ en nitrite (NO_2^-). Les bactéries qui oxydent les NO_2^- en nitrate (NO_3^-) sont quantifiées à partir du nombre de copies des gènes *nrxA* du genre *Nitrobacter* et de l'ARNr 16S du genre *Nitrospira*. Enfin, les bactéries dénitrifiantes sont quantifiées en utilisant l'abondance des deux gènes codant pour la nitrite réductase, *nirS* et *nirK*.

- Les activités enzymatiques microbiennes du cycle de l'azote

De même que pour l'abondance des gènes, les activités enzymatiques de nitrification et de dénitrification ont été utilisées comme paramètres fonctionnels microbiens et réalisées par le LEM (Lyon). L'activité potentielle de nitrification (NEA= Nitrification Enzyme Activity) a été mesurée selon Dassonville *et al.* (2011) afin d'obtenir les paramètres cinétiques (V_{\max} et K_m ; voir ci-dessous) utilisés comme paramètres fonctionnels microbiens de la nitrification. Cette méthode consiste à mesurer l'activité enzymatique potentielle d'oxydation de NH_4^+ en incubant à 28°C en conditions non limitantes en dioxygène, 3-g de sol frais dans 30-ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ avec différentes concentrations de NH_4^+ (0, 0.5, 1, 2, 5 et 15mg d'N L^{-1}). Les productions de nitrite et nitrate sont mesurées après 2, 4, 8 et 10h par chromatographie ionique (DX120; Dionex, Salt Lake City, UT, USA). Le taux maximal de nitrification (V_{\max}) et l'affinité pour le NH_4^+ ($1/K_m$) sont estimés à l'aide d'une courbe des taux de nitrification en fonction des concentrations en NH_4^+ (Lineweaver & Burk, 1934). L'activité enzymatique potentielle de dénitrification (DEA= Denitrification Enzyme Activity) est mesurée selon Attard *et al.* (2011). Du sol frais (équivalent à 10g de sol sec) est placé en condition anaérobie à 28°C dans une atmosphère à 90% d'hélium et 10% d'acétylène afin d'inhiber l'activité nitrite réductase. Dans ce sol, sont ensuite ajoutés 3-ml de KNO_3 (50 μg de N-NO_3^- $\cdot\text{g}^{-1}$ de sol sec), du glucose (0.5 mg C $\cdot\text{g}^{-1}$ de sol sec) et du glutamate de sodium (0.5 mg C $\cdot\text{g}^{-1}$ de sol sec), complétés avec de l'eau distillée pour atteindre la capacité maximum au champ. Le protoxyde d'azote produit est mesuré après 2h, 4h, 5h et 6h par chromatographie gazeuse (microGC RS3000; SRA instruments, Marcy l'Etoile, France).

Les marquages isotopiques

Le marquage isotopique au ^{13}C pour quantifier la rhizodéposition (chapitre 3) et le marquage au ^{15}N pour estimer les flux d'N et la compétition pour cette ressource entre les communautés végétales et microbiennes (chapitre 6) sont détaillés dans les articles scientifiques présentés dans leurs chapitres respectifs.

Références citées:

- Ameel, J.J., Axler, R.P. & Owen, C.J. (1993) Persulfate digestion for determination of total nitrogen and phosphorus in low-nutrient waters. *Am. Environ. Lab.*, 10/93, 1-11.
- Attard, E., S. Recous, A. Chabbi, C. De Berranger, N. Guillaumaud, J. Labreuche, L. Philippot, B. Schmid, and X. Le Roux. 2011. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology* **17**:1975-1989.
- Bardgett, R. D., P. J. Hobbs, and A. Frostegard. 1996. Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology And Fertility Of Soils* **22**:261-264.
- Bardgett, R. D. and E. McAlister. 1999. The measurement of soil fungal : bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology And Fertility Of Soils* **29**:282-290.
- Cornelissen, J. H. C., S. Lavorel, E. Garnier, S. Diaz, N. Buchmann, D. E. Gurvich, P. B. Reich, H. ter Steege, H. D. Morgan, M. G. A. van der Heijden, J. G. Pausas, and H. Poorter. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal Of Botany* **51**:335-380.
- Dassonville, N., N. Guillaumaud, F. Piola, P. Meerts, and F. Poly. 2011. Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions* **13**:1115-1133.
- Frostegard, A., A. Tunlid, and E. Baath. 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods* **14**:151-163.
- Grime, J. P. 1998. Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal Of Ecology* **86**:902-910.
- Hooper, D. U., F. S. Chapin, J. J. Ewel, A. Hector, P. Inchausti, S. Lavorel, J. H. Lawton, D. M. Lodge, M. Loreau, S. Naeem, B. Schmid, H. Setälä, A. J. Symstad, J. Vandermeer, and D. A. Wardle. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* **75**:3-35.
- Jones, D. L. and V. B. Willett. 2006. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:991-999.
- Jones, R. M. and J. N. G. Hargreaves. 1979. Improvements to the dry-weight-rank method for measuring Botanical composition. *Grass and Forage Science* **34**:181-189.
- Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* **56**:658-666.

- Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and steaning parasitic and vascular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**:158-&.
- Robertson, G. P., Coleman, D. C., Bledsoe, C. S. and Sollins, P. 1999. *Standard soil methods for long-term ecological research*. Oxford University Press, New York Oxford.
- Trouvelot, A., J. C. Fardeau, C. Plenchette, S. Gianinazzi, and V. Gianinazzapearson. 1986. Nutritional balance and symbiotic expression in mycorrhizal wheat. *Physiologie Vegetale* **24**:300-300.
- Vance, E. D., P. C. Brookes, and D. S. Jenkinson. 1987. An Extraction Method For Measuring Soil Microbial Biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry* **19**:703-707.
- Waring, S. A. and J. M. Bremner. 1964. Ammonium production in soil under waterlogged conditions as index of nitrogen availability. *Nature* **201**:951-&.
- Wienhold, B. J. 2007. Comparison of laboratory methods and an in situ method for estimating nitrogen mineralization in an irrigated silt-loam soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **38**:1721-1732.

Chapitre 3

Stratégies de gestion des ressources par les plantes et traits fonctionnels végétaux

Relations avec les propriétés microbiennes du sol

Nous avons vu en introduction que les communautés végétales pouvaient avoir une influence sur les communautés microbiennes du sol, et notamment à travers l'exsudation de composés carbonés dans le sol. Pour déterminer quels sont les traits fonctionnels végétaux qui seraient des indicateurs des mécanismes fins gouvernant les interactions entre communautés végétales et communautés microbiennes, des expérimentations en pots en conditions contrôlées ont été mises en place. Dans chacune de ces expérimentations, le sol utilisé a été tamisé et homogénéisé afin d'obtenir des conditions abiotiques les plus similaires possibles entre tous les traitements. Pour identifier plus précisément les effets des traits végétaux, les expérimentations ont été menées à l'échelle de l'individu avec des espèces présentant des stratégies d'acquisition et d'utilisation des nutriments différentes.

L'expérimentation principale de ce chapitre a consisté à cultiver en pots et sous serre trois espèces typiques des prairies du Lautaret avec des stratégies d'exploitation des nutriments différentes se reflétant dans leurs traits fonctionnels. Pendant trois mois, *D. glomerata*, *B. erectus* et *F. paniculata* ont été cultivées car ces espèces nous permettaient d'obtenir un gradient de traits fonctionnels végétaux, allant respectivement de traits caractéristiques d'espèces plus exploitatrice à ceux des espèces conservatrices. Nous avons cultivé ces espèces en présence ou non (par stérilisation du sol) de micro-organismes dans le sol et en apportant ou non un supplément de nutriments. Dans cette étude, nous avons déterminé si les traits fonctionnels (SLA, RNC, capacité d'absorption de l'N...) et les biomasses (aérienne et racinaire...) des végétaux pouvaient être reliés aux activités nitrifiantes et dénitrifiantes du sol ainsi qu'aux paramètres de mycorhization des racines (fréquence et taux de colonisation du cortex racinaire). Puis à travers les traitements de fertilisation, nous avons examiné les effets d'un apport de nutriments sur ces relations. Les résultats présentés dans ce chapitre proviennent d'analyses préliminaires exploratoires du jeu de données. C'est donc un projet d'article rédigé à partir de ces analyses préliminaires qui est présenté puisque la discussion de ma thèse se base en partie sur les premières conclusions que j'ai tirées de ces résultats.

Cependant cette première étude n'a pas analysé les liens directs existants entre les espèces végétales et les propriétés microbiennes du sol, et notamment les patrons d'exsudations de composés carbonés des espèces. Une seconde étude a été mise en place par les partenaires barcelonais du projet VITAL pour étudier la quantité de composés exsudés par des espèces végétales différant par leurs stratégies d'acquisition des nutriments et donc par les traits fonctionnels qui les caractérisent. Une méthode de marquage isotopique continu au ^{13}C pendant 79 jours a été mise au point sur une culture de quatre graminées pérennes provenant de deux des sites du projet VITAL, *Dactylis glomerata* et *Briza media* (espèces prélevées au Lautaret) et *Lolium perenne* et *Antoxanthum odoratum* (espèces prélevées en Angleterre), cultivées sur un sol très pauvre avec ou sans fertilisation azotée. Après deux mois de marquage continu avec cette méthode la quantité d'exsudats déposés dans le sol par chacune de ces espèces a été quantifiée, et les analyses ont recherché quels étaient les traits fonctionnels végétaux qui reflétaient le mieux les différences de patrons d'exsudation entre espèces, et selon les effets de la fertilisation. Enfin, nous avons examiné si la fertilisation avait un impact sur ces patrons d'exsudations et les communautés microbiennes du sol assimilant ces composés carbonés. Les résultats et conclusions de cette étude sont présentés sous forme d'un article (en préparation pour *Journal of Experimental Botany*) en annexe de ma thèse puisque ma contribution y a été mineure en comparaison des autres travaux de recherche présentés dans ma thèse, et a principalement concerné l'interprétation des mécanismes et la participation à la rédaction finale.

Article 1

Impacts of contrasting plant resource economies on rhizosphere microbial communities

Legay N, Grassein F, Puissant J, Personeni E, Perigon S, Binet MN, Poly F, Pommier T, Clément J-C, Geremia RA, Arnoldi C, Lavorel S and Mouhamadou B.

Project of article with exploratory analyses

Abstract

It is well recognised that plant species influence the structure and activities of soil microbial communities. This ability of plants to influence soil microbes results from their functional traits, in particular those related to the amount and quality of litter and to root exudates. However these effects may be modulated by abiotic factors which impacted plant functional traits, making it difficult to determine how and which plant traits affect resources to soil microbes. We grew three grass species differing in their traits associated with nutrient economic, and quantified the effects on fungal community colonization and bacterial activities of their above or below-ground traits in interaction with nutrient supply. As expected, the influences of plant species on microbial properties varied with soil nutrient availability. Under lower soil inorganic N availability plants allocated more carbon (C) to their belowground tissues to increase soil prospection. This response took the form of either an increase in total root biomass for the more exploitative species *Dactylis glomerata*, or of an increase in root tissue density associated with greater intensity in mycorrhizal colonisation in the more conservative species *Festuca paniculata*. The higher denitrification activities under *Dactylis glomerata* suggest that greater root biomass was associated with higher exudation, which benefited bacterial heterotrophic activities. In contrast the greater arbuscular mycorrhizal colonisation in roots of *Festuca paniculata* suggested that C was preferentially attributed to the host fungi. Together these results support the impact of root functional traits on bacterial activities and arbuscular mycorrhizal colonisation through their responses to soil nutrient availabilities.

Key words: leaf traits, root traits, denitrification enzyme activity, nitrification enzyme activity, mycorrhizal colonisation, nutrient availability.

Introduction

Soil microorganisms control a wide range of ecosystem processes. They are involved in various biological processes such as carbon and nitrogen cycling (Kowalchuk and Stephen 2001, Hogberg et al. 2001; van der Heijden et al. 2008) and influence plant growth and plant nutrient availability (Smith and Read 1997; Sprent 2001; van der Heijden et al. 2008). Understanding the key factors that regulate soil microbial communities is therefore crucial to the understanding of ecosystem functioning and to anticipate ecosystem responses to global changes (Bardgett & Wardle 2010).

Previous studies have shown that plant species influence soil microbial characteristics such as community size, community composition and physiological activity (Grayston *et al.*, 1998; Wardle *et al.*, 2003; Harrison and Bardgett 2010). For instance, at an individual plant level, numerous studies have shown the effects grass species on fungal communities (Kardol *et al.*, 2007; De Deyn & Van der Putten, 2008; Rooney *et al.*, 2009). More specifically, Orwin *et al.*, (2010) demonstrated that leaf traits and litter quality associated to plant species with a high relative growth rate influenced microbial communities by promoting the relative abundance of bacteria over fungi in the soil. At the plant community and ecosystem levels, the impact of plant diversity and community structure on the soil microorganisms and their functioning has also been shown (Hedlund *et al.*, 2003; Eisenhauer *et al.*, 2010; De Deyn *et al.*, 2011). In general, the ability of plants to influence soil microbial resources results from their ecophysiological traits, in particular those related to the amount and quality of litter and root exudates (Wardle *et al.*, 1998; Bardgett and Wardle, 2010). Soil microbial communities directly depend on resources available to them, and notably N and C availabilities that they required for their growth and activities (Attard *et al.*, 2011; Falcao-Salles *et al.*, 2012). These can be affected by litter and by root exudates which vary qualitatively and quantitatively at least at the inter-specific level (Bais *et al.*, 2006; Standing *et al.*, 2007; Millard and Singh, 2010; Cesco *et al.*, 2012). It can be suggested that plant traits which affect the quantity and quality of litter and exudates, such as plant growth rate and size (Wardle *et al.*, 1998), specific leaf area and leaf dry matter content (Cornelissen *et al.*, 1999; Kazakou *et al.*, 2006), as well as belowground traits *e.g.* root turnover, chemistry, exudation and N uptake (Innes *et al.*, 2004), may thereby potentially influence soil microbial communities. Lastly, certain plant functional traits and abiotic factors explain soil microbial community patterns at landscape-scale (De Vries *et al.*, 2012), and this may impact ecological processes such as C and N cycling (Lamarque et al. in revision).

Although it has been shown that plant functional traits affect microbial communities (Orwin *et al.*, 2010; Legay *et al.*, submitted), these effects may be modulated by the impact of abiotic factors on plant functional traits. For example, management practices, in particular nitrogen fertilization, have been shown to alter plant vegetative height and leaf traits e.g. leaf dry matter content and nitrogen concentration (Lavorel *et al.*, 2011), and thereby ecosystem functioning (Wardle *et al.*, 1998; Lavorel *et al.*, 2011; Pakeman, 2011). At the same time, it has been suggested that nitrogen fertilization effects on soil microorganism communities could also be mediated by plant trait effects on soil microorganisms (De Deyn *et al.*, 2011). Thus, while there is some information on plant traits or abiotic factors influencing resources and thereby the structure of microbial communities, knowledge and understanding are limited on which specific plant traits and mechanisms are involved, and how this vary in response to abiotic conditions.

The aim of this study was to investigate the effects of plant functional traits related to nutrient acquisition and turnover on soil microbial communities. Three grass species dominant in subalpine grasslands from the Central French Alps (Quétier *et al.*, 2007) and differing in these traits were grown at two levels of fertilization under controlled conditions. *Festuca paniculata* is a conservative species with traits indicative of slow nutrient turnover (Gross *et al.*, 2007), and able to use highly efficiently different mineral nitrogen sources even at low concentrations (Grassein *et al.*, submitted). *Dactylis glomerata* has a more exploitative strategy, with traits indicative of a faster nutrient turnover (Gross *et al.*, 2007) and requires greater availability of ammonia and nitrate (Grassein *et al.*, submitted), whereas *Bromus erectus* has intermediate characteristics. Mycorrhizal colonisation of each plant species by arbuscular mycorrhizal fungi, under fertilized vs. unfertilized conditions, was characterized by microscopic analysis. Potential denitrification and nitrification enzyme activities as well as above- and below- plant traits were also determined. We tested whether differences in microbial activities and mycorrhizal colonisation were associated with above or below-ground plant traits depending or not on N-fertilization. We then tested whether mycorrhizal colonization and bacterial activities responded to the same plant traits in microcosm experiments. We hypothesized that: (1) plant traits related to N acquisition and turnover and particularly root traits explained plant effects on microbial activities and mycorrhizal colonization, and that (2) plant functional traits related to high nutrient acquisition and rapid turnover were preferentially linked to bacterial activities rather than to mycorrhizal colonization which were related to opposite plant functional traits.

Materials and methods

Species

Three co-occurring grasses, *Dactylis glomerata*, *Bromus erectus* and *Festuca paniculata*, differing in their relative growth rates (Grassein *et al.*, 2010 Gross *et al.*, 2007) were sampled in the upper Romanche valley of the central French Alps (45.041°N 6.341°E, 1650–2000 m a.s.l.). Three mother tillers of each species were collected in the field during autumn 2010 and were kept for two months in osmotic water and perlite in order to favour clonal growth. Each clone was separated into individual tillers which were clipped at 6-cm for the aboveground part and 4-cm for the belowground part at the implantation.

Growing conditions

Plants were grown in a mix of perlite 1/6 (volume) and soil 5/6 (volume) collected in the field, with the following characteristics: clay, 30%; silt 46%; sand 24%; total carbon content: 44.4 g.kg⁻¹; total nitrogen content, 4.14 g.kg⁻¹; pH (H₂O), 5.5-6. The soil was air-dried and sieved at 5-mm, then, a subsample was sterilised using gamma-rays. Cylindrical PVC boxes (684-cm³) were filled with 500 g of the mixed substrate where two individuals per species were planted. Each pot was watered daily to keep humidity at 20 g water 100 g⁻¹ dry soil. In the glasshouse, plants were exposed to artificial lighting (400-W high-pressure sodium lamps, Philips Son-T-pia Agro) providing 450-μmol.m⁻².s⁻¹ photosynthetically active radiation (PAR) at plant height with a 16/8 h photoperiod cycle. Air temperature was kept at 20/16 ± 2°C (day/night). Pots were moved each day to avoid any positional effect. Plants were supplied with a nutritive solution corresponding to a Hoagland /4 without nitrogen (0.18 mM CaCO₃, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.15 mM K₂HPO₄, 3 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA 2NaFe (3H₂O), 14 μM H₃BO₃, 3 μM ZnCl₂, 0.7 μM CuCl₂, and 0.7 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.1 μM CoCl₂) to avoid any micronutrient limitation.. Fertilised plants received 24.5 mg per pot in the form of a urea-based slow release N:P:K fertilizer (20:10:10). One day before sampling, each pot received 3.2 mg N supplied as 100 atom% ¹⁵NH₄¹⁵NO₃. In total, 36 pots (3 plant species × 2 fertilization levels x 2 soil treatments i.e. sterilized or non-sterilized soils x 3 replicates).

Harvest and plant traits measurements

The three species were cultivated during three months after implantation. At harvest, roots were clipped from the aerial part and plant traits were measured according to standardised protocols (Cornelissen *et al.*, 2003). The youngest fully expended leaf of each individual was

collected separately for area determination using a LICOR Li-3100, then its fresh biomass and total aboveground fresh biomass were weighted before being dried for 72 h at 60°C for dry matter content (DM) determination. The total root system was gently shaken to obtain 20 g of “root adherent” soil (considered as “rhizosphere” soil). “Bulk soil” was sampled in the soil where no root was detected. Fresh mixed soil (50 g for each of rhizosphere and bulk) were weighted and dried at 105°C during 48 h for soil water content determination. Then the total root biomass was washed on a 0.5-mm sieve to avoid any loss of fine roots. The root biomass was split in three aliquots. One aliquot was dried at 60°C, the two others were kept fresh in an alcoholic solution (ethanol 10%, acetic acid 5% v: v) until i) arbuscular mycorrhizal determination (see below) and ii) root morphology determination by digital scanning. For that, roots were suspended in 1-cm of water in a 29 × 42-cm clear acrylic tray and scanned at 300 dpi using a flatbed scanner (Epson Expression 10000XL). Each digital root image was processed using WINRHIZO software (Regent Instruments Inc., Canada) to determine total root length and average root diameter. This aliquot of the root biomass was also dried for 72 h at 60°C for DM content determination in order to calculate Specific Root Length (SRL).

Soil properties

Fresh soil samples were weighed and sieved through a 5.6-mm mesh, stored at 4°C, and thoroughly (within 48h) processed for the determination of soil moisture, soil organic matter content and soil nutrient contents (ammonium ($\text{NH}_4^+\text{-N}$), nitrate ($\text{NO}_3^-\text{-N}$), total dissolved nitrogen (TDN), and dissolved organic nitrogen (DON)). Subsamples of fresh soil were dried at 70°C during one week to determine soil water content (SWC), followed by 4h at 550°C to determine soil organic matter content (SOM). Soil subsamples were air dried and ground to measure total soil C and N contents with an elemental analyser (FlashEA 1112, Thermo Electron Corporation). Soil nitrogen forms were measured from K_2SO_4 (0.5 M) soil extracts (Jones and Willett, 2006) using a FS-IV colorimetric chain (OI-Analytical Corp., TX, USA) according to Robertson *et al.* (1999).

Microbial activities

Potential rates of nitrification were estimated following an adapted protocol from Koper *et al.* (2010) and Dassonville *et al.* (2011). Briefly, 3 g fresh soil from each pot was incubated under aerobic conditions (180 rpm, 28 °C, 10 h) in a solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0, 0.5, 1, 2, 5 and 15 mg N L⁻¹). Rates of NO_2 and NO_3 production were measured after 2, 4, 8 and 10 h by ionic chromatography (DX120; Dionex, Salt Lake City, UT, USA). Maximal nitrification rate

(V_{\max}) was assessed by plotting nitrification rates along the gradient of NH_4 concentrations (Lineweaver & Burk, 1934).

Potential denitrification activity (DEA) was determined according to Attard *et al.* (2011). Briefly, c. 10 g dw soil was placed at 28°C under anaerobic conditions using He: C_2H_2 (90:10) mixture inhibiting N_2O -reductase activity. Each flask was supplemented with c. 3-mL KNO_3 (50- $\mu\text{g N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}$ dw), glucose (0.5-mg $\text{C} \cdot \text{g}^{-1}$ dw) and sodium glutamate (0.5-mg $\text{C} \cdot \text{g}^{-1}$ dw), completed with distilled water to reach the water-holding capacity. N_2O was measured at 2, 4, 5 and 6 h using a gas chromatograph (microGC RS3000; SRA instruments, Marcy l'Etoile, France).

Analysis of root mycorrhizal colonization

Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi was determined on roots collected from the two individuals per pot. Roots were previously washed and kept fresh in alcoholic solution. After digestion in KOH solution, roots were stained with trypan blue in glycerol (Phillips & Hayman, 1970). Mycorrhizal intensity and frequency were determined as described by Trouvelot *et al.* (1986) using the MYCOCALC program (<http://www.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>). The intensity of mycorrhizal colonisation (%M) gives an estimation of the amount of colonized root cortex in the whole root system. The mycorrhizal frequency (F%) gives the percentage of root fragments colonized by AM fungi.

Statistical analysis

As a preliminary analysis, Principal Component Analysis (PCA) was conducted to explore relationships between plant above- and below-ground traits and their variability within species (Appendix 1). The effects of species and N-fertilization on plant, microbial and soil properties were tested using a two-ways ANOVA. A Tukey's Studentized Range (HSD - Honest Significant Differences) test was used to examine a posteriori differences among treatments. PCA and ANOVA were performed in JMP 7.0 (SAS Institute, Cary NC). Then, to determine among all plant traits and soil parameters, those involved in variation of microbial properties, we applied a multi-step analysis using multivariate linear regression for the non-sterilised pots. To do this, we ran a forward selection with the R package packfor (Dray *et al.*, 2007) using Redundancy Analyses (RDA) with plant, and soil variables as explanatory variables and microbial properties as response variables ($P < 0.05$ after 9999 random permutation). We applied the double-procedure proposed by Blanchet *et al.* (2008) to limit

the problems of classical forward selections. Inflated Type I error was avoided by forward selecting only models for which a global test where all explanatory variables was significant. The overestimation of the amount of variance explain was avoided by introducing an additional stopping criterion in that the adjusted coefficient of multiple determination (R^2_{adj}) of the model could not exceed the R^2_{adj} obtained when using all explanatory variables. The variables that fulfilled both stopping criteria were identified as the significant plant and soil variables influencing the microbial properties. These statistical analyses were performed in R version 2.15.1 using the library ‘vegan’ 1.17-3 (Oksanen *et al.*, 2008), and the package ‘packfor’ (Dray *et al.*, 2007). Where necessary, data were transformed to better comply with the criteria of normality and homoscedasticity required for analyses.

Results

Effects of fertilisation and sterilization on plant, soil and microbial parameters

Sterilisation was successful in suppressing any nitrification activity and mycorrhization (Table 1, Table 2). Some denitrification activity was detected in sterilised soils, and likely as a result there were significant effects of sterilisation on soil properties (especially a decrease in available inorganic N, and specifically ammonium) and leaf and shoot N concentrations and C:N. Overall, hereafter we consider that plant effects on microbial communities in non-sterilised soils were the results of the interactions of the planted species with the original inoculum carried by the field soil.

Table 1: Effect of species, fertilisation and sterilisation on plant functional traits and properties, soil properties, bacterial activities and mycorrhizal colonisation. Values are results of ANOVAs (F) and significance (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: not significant).

	Species (S)		Fertilisation (F)		S x F		Sterilisation (ST)		S x ST		F x ST		S x F x ST	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Specific leaf area	132.52	***	0.53	ns	0.33	ns	2.9	ns	0.1	ns	0.05	ns	2.19	ns
Leaf dry matter content	34.26	***	4.11	ns	3.48	*	3.7	ns	2.21	ns	0.55	ns	9.49	**
Leaf N concentration	34.85	***	4.76	*	1.7	ns	8.6	**	1.31	ns	2.77	ns	1.12	ns
Leaf C:N ratio	13.17	***	1.87	ns	0.09	ns	8.55	**	1.69	ns	1.2	ns	1.01	ns
Shoot N concentration	20.43	***	0.85	ns	2.08	ns	8.06	**	0.19	ns	2.52	ns	0.3	ns
Shoot C:N ratio	15.75	***	0.34	ns	1.07	ns	7.91	*	1.77	ns	1.79	ns	0.17	ns
Root N content	26.79	***	1.77	ns	2.08	ns	1.62	ns	1.71	ns	1.2	ns	0.31	ns
Root C content	21.86	***	1.24	ns	4.31	*	5.44	*	0.92	ns	1.52	ns	2.75	ns
Root C:N ratio	72.33	***	1.43	ns	5.13	*	1.82	ns	1.14	ns	3.54	ns	1.32	ns
Aboveground Biomass	45.39	***	3.15	ns	1.11	ns	9.78	**	2.03	ns	4.14	ns	0.03	ns
Root Mass	72.21	***	4.33	*	1.81	ns	1.62	ns	3.47	*	6.57	*	0.52	ns
Root dry matter content	15.36	***	4.73	*	0.75	ns	0.1	ns	2.65	ns	4.81	*	0.68	ns
Specific root length	13.13	***	0.08	ns	0.22	ns	2.61	ns	0.06	ns	0.19	ns	0.93	ns
Soil water content	5.45	*	0.42	ns	3.52	*	3.39	ns	5.69	*	1.2	ns	3.04	ns
Soil organic matter	0.5	ns	0.05	ns	1.12	ns	4.78	*	1.45	ns	0.41	ns	0.29	ns
Soil N-NO ₃ ⁻ concentration	62.74	***	5.03	*	1.27	ns	2.35	ns	6.91	**	6.38	*	3.77	*
Soil N-NH ₄ ⁺ concentration	21.71	***	0.49	ns	0.23	ns	24.53	***	12.4	***	5.7	*	1.2	ns
Denitrification enzyme activity	1.91	ns	6.65	*	0.08	ns	57.59	***	6.04	**	7.85	*	1.85	ns
Nitrification enzyme activity	4.03	*	1.7	ns	0.68	ns	19.91	***	4.03	*	1.7	ns	0.68	ns
Mycorrhizal frequency	4.51	*	0.1	ns	0.02	ns	308.28	***	4.52	*	0.1	ns	0.03	ns
Mycorrhizal root colonisation	5.4	*	0.04	ns	0.24	ns	34.14	***	5.4	*	0.04	ns	0.24	ns

Fertilisation had limited effects on plant traits since only LNC, Root Mass and RDMC changed significantly when fertilizer was applied (Table 1). One plant traits showed interactive effects of fertilisation and plant species since only *B. erectus* showed an increase of RCN (Table 1). Fertilisation has also limited effects on soil and microbial properties since only N-NO₃⁻ and DEA differed significantly when fertiliser was applied (Table 1).

Soil microbial communities showed different responses with species identity. The two mycorrhizal colonisation parameters were higher in roots of *F. paniculata*. Although DEA showed no differences between species, NEA was higher in soil with *F. paniculata*. Finally, soil N-NO_3^- and N-NH_4^+ were both lower in soil under *D. glomerata*.

Table 3: Redundancy analyses for responses of bacterial activities and mycorrhization colonization to plant and soil properties. The F values correspond to the test of all models and significance (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$). Abbreviations: denitrification enzyme activity (DEA), nitrification enzyme activity (NEA), intensity of mycorrhizal colonisation (%M), mycorrhizal frequency (%F), root nitrogen concentration (RNC), root carbon concentration (RCC), root C:N ratio (RC:N), RM (root mass), shoot nitrogen concentration (Shoot NC) and soil organic matter (SOM).

Response variables	F	p	Explanatory variables	
			Soil	Plant
Bacterial activities (NEA and DEA)	18.07	***	Ammonium	RNC + RCC
Mycorrhization (%M and %F)	15.54	***	SOM	RCN ; Shoot NC ; RM

Responses of bacterial activities to soil parameters and plant functional traits

In non-sterilized soil, variable selection using multivariate linear regression showed that variations of the two bacterial activities were related to ammonium and root chemical composition (RNC and RCC) (Table 3). Projections in the RDA axes showed that greatest contrast among pots regarded NEA, which was positively linked to ammonium availability on axis 1, whereas DEA was positively related to RCC and conversely negatively related to RNC on axis 2 (Fig. 1).

Variations of arbuscular mycorrhizal colonization along soil and plant properties

In non-sterilized soil, arbuscular mycorrhizal colonization was mainly related to plant properties and notably, root mass and plant chemical properties (Table 3). Projections in the RDA axes showed that the root C:N ratio was the primary, positive driver of both frequency and intensity of mycorrhization (axis 1), while shoot nitrogen content was negatively related

to arbuscular mycorrhizal frequency, and mycorrhizal intensity was negatively related to total root mass (axis 2). Of the soil properties, only SOM content was positively related to arbuscular mycorrhizal frequency (Fig. 2).

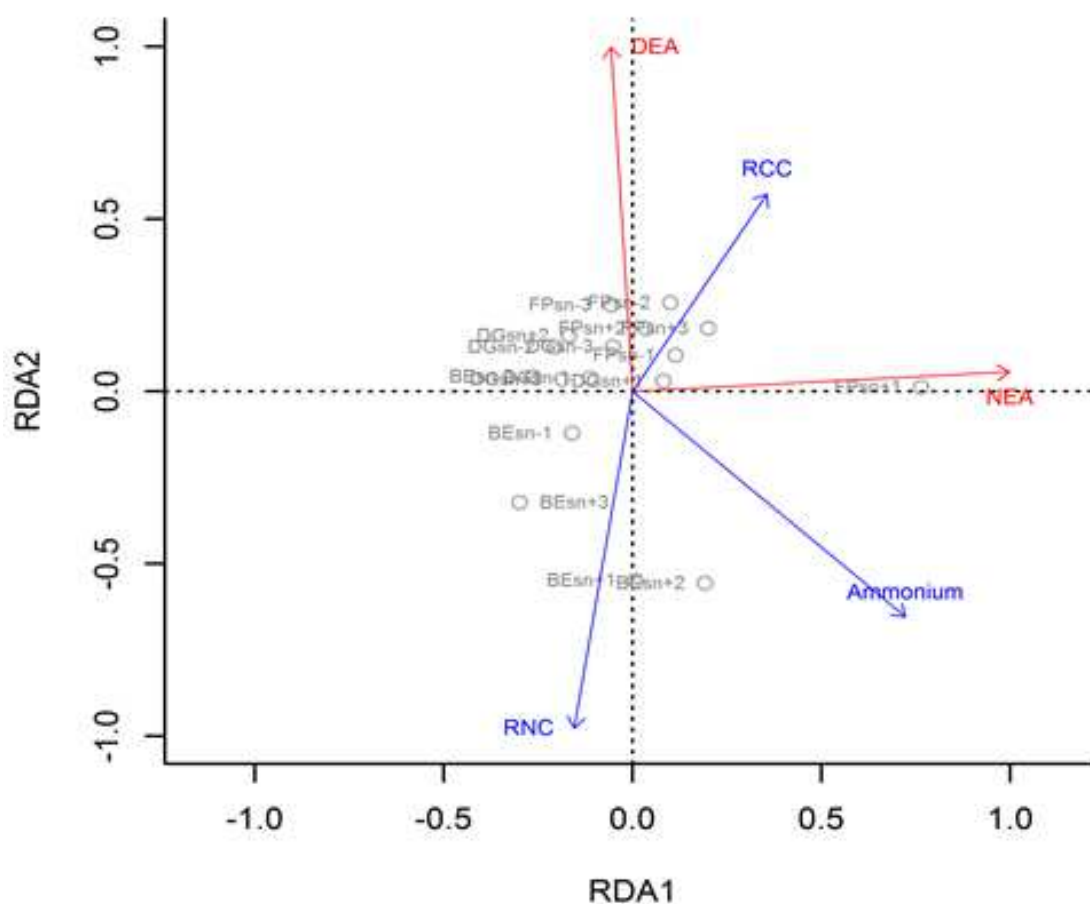


Figure 1: Redundancy analysis scores for bacterial activities. Abbreviations: denitrification enzyme activity (DEA), nitrification enzyme activity (NEA), root nitrogen concentration (RNC), root carbon concentration (RCC), soil ammonium concentration (Ammonium).

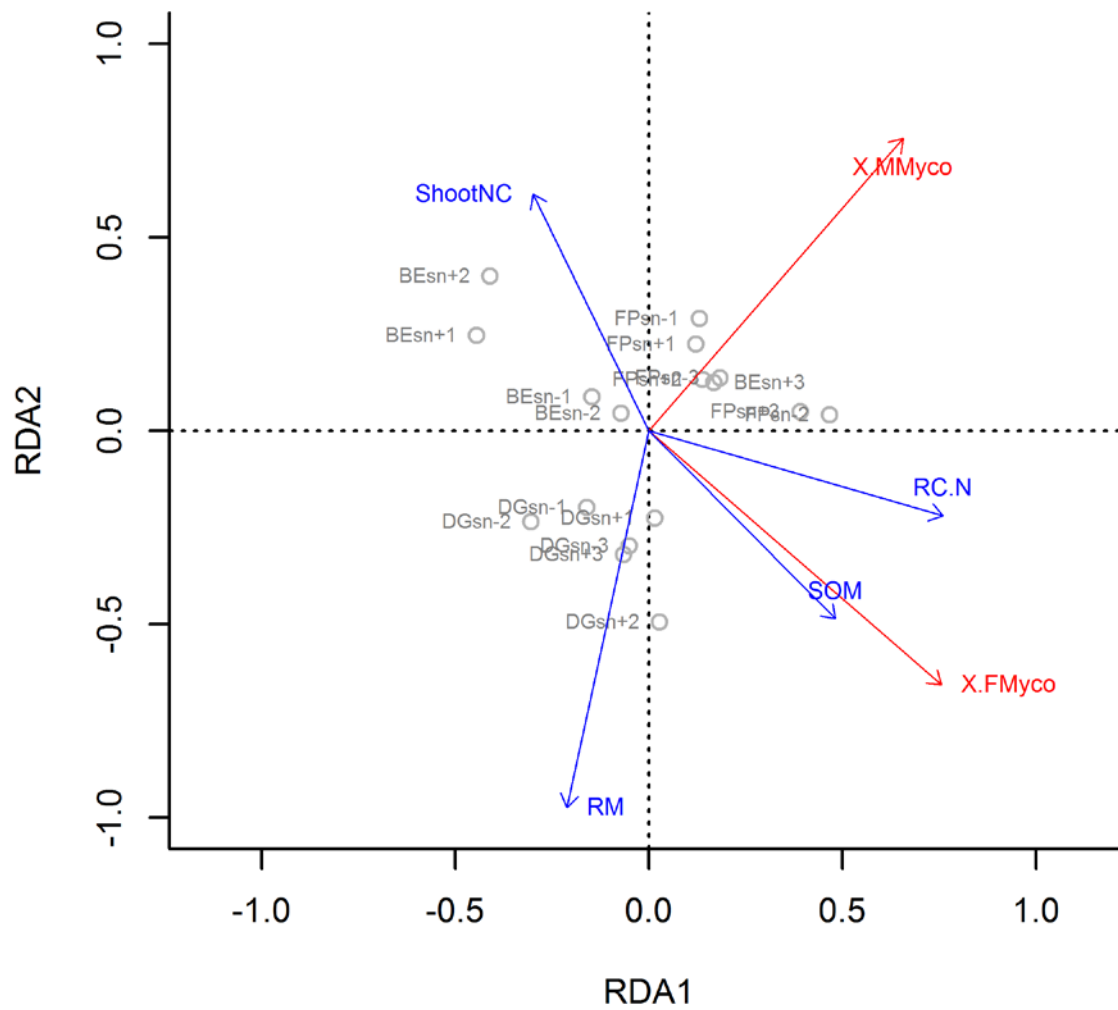


Figure 2: Redundancy analysis scores for mycorrhizal colonization. Abbreviations: intensity of mycorrhizal colonisation (X.MMyco), mycorrhizal frequency (X.FMyco), Shoot nitrogen concentration (ShootNC), root C.N ratio (RC.N), root biomass (RM), soil organic matter (SOM).

Discussion

Responses of nitrification and denitrification enzymes activities to soil and plant properties

As expected, plant functional traits influenced bacterial activities related to N transformations. This link concerned mainly DEA which was negatively related to RNC whereas the positive relation with RCC was likely just the opposition between RNC and RCC). To the best of our knowledge, such a relationship between plant nitrogen concentrations and DEA has not been previously reported in the literature, even if other links have been shown with phyletic microbial community structure (e.g. fungi to bacteria ratio - Porazinska *et al.*, 2005; Orwin *et al.*, 2010) or with microbial activities (Valé *et al.*, 2005, Laughlin *et al.*, 2011). In many cases, plant trait effects on microbial properties have been explained by the impact of litter quality (Wardle *et al.*, 1992; Laughlin *et al.*, 2011), or by co-variation with the quality and quantity of exudates produced by plants (Griffiths *et al.*, 1999; Valé *et al.*, 2005). Given the design and duration of our experiment we can exclude litter effects. Consequently, the observed patterns suggest that changes in quantity and quality of exudates were responsible for the negative relationship between RNC and DEA. This pattern reflected simultaneous responses and potentially competition between plants and denitrifiers for nitrate. Indeed, DEA was higher in soils where soil nitrate concentration was the lowest and RNC the lowest (*D. glomerata*). This contradicts other studies in which DEA is positively related to soil nitrate contents (Henry *et al.*, 2008; Attard *et al.* 2011). Yet, *D. glomerata* has been shown to increase its root biomass to better explore the soil when soil nitrate availability was limited (Robinson *et al.*, 1999; Crush *et al.*, 2005). Because high root biomass has been related to high C rhizodeposition (Van der Krift *et al.*, 2001; Pausch *et al.*, 2013), which represents a major energy source for the denitrifiers (Falçao-Salles *et al.*, 2012), we suggest that our high DEA values were related to high C exudation by species with high root mass. Finally, the opposite relationship between DEA and RNC may be explained by a competition between denitrifiers and roots N uptake.

NEA was positively related to nutrient availabilities (i.e., ammonium and nitrate), which is largely accepted in the literature. We suggest that competition for nitrogen-ammonium uptake occurred between plants and microbes (Skiba *et al.*, 2011). Indeed, we found that NEA was reduced in the soil under the *Dactylis glomerata* where soil ammonium concentration tended to be the lowest (non-significant differences between species for soil ammonium probably due

to low replicat numbers). This was also supported by the study of Grassein *et al.* (submitted) who observed that *D. glomerata* assimilated more inorganic N than *F. paniculata*. Hence plant species taking up large amounts of inorganic N could diminish soil ammonium concentration, and hence initiate a competition for this inorganic N form with nitrifiers.

Variations of mycorrhizal colonization along with soil and plant properties

Arbuscular mycorrhizal fungi and particularly AMF are known to improve soil prospection and enhance host plant nutrition by supplying nutrients and water that are not directly accessible to the roots (Hodge *et al.*, 2000a; Miller & Cramer, 2004; Wardle *et al.*, 2004 ; Van der Heijden *et al.*, 2008). Although we did not find any effects of the fertilization treatment, arbuscular mycorrhizal frequencies were related to plant functional traits reflecting soil nutrient availability. Indeed, arbuscular mycorrhizal frequency was positively linked to high root C:N and low shoot N content which suggest that soil nutrient were not available for plants. Hence, in the case of low inorganic N availability, plants could favour arbuscular mycorrhizal colonization (Bonneau *et al.*, 2013). Moreover, the negative relationship between total root mass and the proportion of colonized root cortex in the whole root system supports this suggestion. In fact, high root mass enables a better soil prospection under nutrient-poor soil conditions (Robinson *et al.*, 1999; Crush *et al.*, 2005), or in heterogeneous rich-nutrient patches (Hodge *et al.*, 2000b), and limits the need for plants to maintain arbuscular mycorrhizal association. This was further supported by *F. paniculata* which presented the highest root colonization rates, the lowest total root mass, and was also characterized by the highest root dry matter content (RDMC) which is a root functional trait favouring mycorrhizal colonization (Urcelay *et al.*, 2009). Hence plant species with reduced ability to uptake inorganic N or to prospect soil could favour the mycorrhizal association.

Conclusion

The results of our study contributed to the understanding of the relationships between plant functional traits and microbial functional properties. We observed that nutrient acquisition may be improved either through a high root biomass to better prospect the soil volume (i.e. *D. glomerata*), or through a greater development of arbuscular mycorrhizal associations (i.e. *F. paniculata*). Conservative species such as *F. paniculata* had simultaneously the lowest root biomass, limited shoot N content, high RDMC, high RC:N ratio, and favoured mycorrhizal colonisation, which is expected to increase the volume of soil propected. Conversely, *D. glomerata* showed the lowest arbuscular mycorrhizal colonization together with the highest

root biomass which directly improved soil prospection and probably stimulated DEA thanks to an increase of soil C rhizodeposition. Further investigations on other plant species from distinct functional groups and with different functional traits are required to confirm these relationships observed between plant functional traits and microbial properties.

References

- Attard, E., S. Recous, A. Chabbi, C. De Berranger, N. Guillaumaud, J. Labreuche, L. Philippot, B. Schmid, and X. Le Roux. 2011. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology* **17**:1975-1989.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, and J. M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Pages 233-266 *Annual Review of Plant Biology*.
- Bengtson, P., J. Barker, and S. J. Grayston. 2012. Evidence of a strong coupling between root exudation, C and N availability, and stimulated SOM decomposition caused by rhizosphere priming effects. *Ecology and Evolution* **2**:1843-1852.
- Blanchet, F. G., P. Legendre, and D. Borcard. 2008. Forward selection of explanatory variables. *Ecology* **89**:2623-2632.
- Bonneau, L., S. Huguet, D. Wipf, N. Pauly, and H.-N. Truong. 2013. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*:n/a-n/a.
- Cesco, S., T. Mimmo, G. Tonon, N. Tomasi, R. Pinton, R. Terzano, G. Neumann, L. Weisskopf, G. Renella, L. Landi, and P. Nannipieri. 2012. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biology And Fertility Of Soils* **48**:123-149.
- Cornelissen, J. H. C., S. Lavorel, E. Garnier, S. Diaz, N. Buchmann, D. E. Gurvich, P. B. Reich, H. ter Steege, H. D. Morgan, M. G. A. van der Heijden, J. G. Pausas, and H. Poorter. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal Of Botany* **51**:335-380.
- Cornelissen, J. H. C., N. Perez-Harguindeguy, S. Diaz, J. P. Grime, B. Marzano, M. Cabido, F. Vendramini, and B. Cerabolini. 1999. Leaf structure and defence control litter decomposition rate across species and life forms in regional floras on two continents. *New Phytologist* **143**:191-200.
- Craine, J. M., D. A. Wedin, F. S. Chapin, and P. B. Reich. 2003. Relationship between the structure of root systems and resource use for 11 North American grassland plants. *Plant Ecology* **165**:85-100.
- Crush, J. R., J. E. Waller, and D. A. Care. 2005. Root distribution and nitrate interception in eleven temperate forage grasses. *Grass and Forage Science* **60**:385-392.

- Dassonville, N., N. Guillaumaud, F. Piola, P. Meerts, and F. Poly. 2011. Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions* **13**:1115-1133.
- De Deyn, G. B., H. Quirk, and R. D. Bardgett. 2011. Plant species richness, identity and productivity differentially influence key groups of microbes in grassland soils of contrasting fertility. *Biology Letters* **7**:75-78.
- de Vries, F. T., P. Manning, J. R. B. Tallowin, S. R. Mortimer, E. S. Pilgrim, K. A. Harrison, P. J. Hobbs, H. Quirk, B. Shipley, J. H. C. Cornelissen, J. Kattge, and R. D. Bardgett. 2012. Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecology Letters* **15**:1230-1239.
- Dray, S. and A. B. Dufour. 2007. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**:1-20.
- Eisenhauer, N., H. Bessler, C. Engels, G. Gleixner, M. Habekost, A. Milcu, S. Partsch, A. C. W. Sabais, C. Scherber, S. Steinbeiss, A. Weigelt, W. W. Weisser, and S. Scheu. 2010. Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology* **91**:485-496.
- Elberse, W. T. and F. Berendse. 1993. A Comparative-Study Of The Growth And Morphology Of 8 Grass Species From Habitats With Different Nutrient Availabilities. *Functional Ecology* **7**:223-229.
- Grassein, F., I. Till-Bottraud, and S. Lavorel. 2010. Plant resource-use strategies: the importance of phenotypic plasticity in response to a productivity gradient for two subalpine species. *Annals Of Botany* **106**:637-645.
- Grayston, S. J., S. Q. Wang, C. D. Campbell, and A. C. Edwards. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* **30**:369-378.
- Griffiths, B. S., K. Ritz, N. Ebbelwhite, and G. Dobson. 1999. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology & Biochemistry* **31**:145-153.
- Gross, N., K. N. Suding, S. Lavorel, and C. Roumet. 2007. Complementarity as a mechanism of coexistence between functional groups of grasses. *Journal Of Ecology* **95**:1296-1305.
- Harrison, K. A. and R. D. Bardgett. 2010. Influence of plant species and soil conditions on plant-soil feedback in mixed grassland communities. *Journal Of Ecology* **98**:384-395.

- Hedlund, K., I. S. Regina, W. H. Van der Putten, J. Leps, T. Diaz, G. W. Korthals, S. Lavorel, V. K. Brown, D. Gormsen, S. R. Mortimer, C. R. Barrueco, J. Roy, P. Smilauer, M. Smilauerova, and C. Van Dijk. 2003. Plant species diversity, plant biomass and responses of the soil community on abandoned land across Europe: idiosyncrasy or above-belowground time lags. *Oikos* **103**:45-58.
- Henry, S., S. Texier, S. Hallet, D. Bru, C. Dambreville, D. Cheneby, F. Bizouard, J. C. Germon, and L. Philippot. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environmental Microbiology* **10**:3082-3092.
- Hodge, A., D. Robinson, and A. Fitter. 2000a. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Science* **5**:304-308.
- Hodge, A., J. Stewart, D. Robinson, B. S. Griffiths, and A. H. Fitter. 2000b. Competition between roots and soil micro-organisms for nutrients from nitrogen-rich patches of varying complexity. *Journal Of Ecology* **88**:150-164.
- Hogberg, P., A. Nordgren, N. Buchmann, A. F. S. Taylor, A. Ekblad, M. N. Hogberg, G. Nyberg, M. Ottosson-Lofvenius, and D. J. Read. 2001. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature* **411**:789-792.
- Innes, L., P. J. Hobbs, and R. D. Bardgett. 2004. The impacts of individual plant species on rhizosphere microbial communities in soils of different fertility. *Biology And Fertility Of Soils* **40**:7-13.
- Johnson, N. C. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist* **185**:631-647.
- Jones, D. L. and V. B. Willett. 2006. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:991-999.
- Kazakou, E., D. Vile, B. Shipley, C. Gallet, and E. Garnier. 2006. Co-variations in litter decomposition, leaf traits and plant growth in species from a Mediterranean old-field succession. *Functional Ecology* **20**:21-30.
- Koper, T. E., J. M. Stark, M. Y. Habteselassie, and J. M. Norton. 2010. Nitrification exhibits Haldane kinetics in an agricultural soil treated with ammonium sulfate or dairy-waste compost. *Fems Microbiology Ecology* **74**:316-322.
- Kowalchuk, G. A. and J. R. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* **55**:485-529.

- Kuzyakov, Y. 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:425-448.
- Laughlin, D. C. 2011. Nitrification is linked to dominant leaf traits rather than functional diversity. *Journal Of Ecology* **99**:1091-1099.
- Lavorel, S. and E. Garnier. 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* **16**:545-556.
- Lavorel, S., K. Grigulis, P. Lamarque, M. P. Colace, D. Garden, J. Girel, G. Pellet, and R. Douzet. 2011. Using plant functional traits to understand the landscape distribution of multiple ecosystem services. *Journal Of Ecology* **99**:135-147.
- Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* **56**:658-666.
- McIntyre, S. and S. Lavorel. 2007. A conceptual model of land use effects on the structure and function of herbaceous vegetation. *Agriculture Ecosystems & Environment* **119**:11-21.
- Millard, P. and B. K. Singh. 2010. Does grassland vegetation drive soil microbial diversity? *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **88**:147-158.
- Miller, A. E. and W. D. Bowman. 2002. Variation in nitrogen-15 natural abundance and nitrogen uptake traits among co-occurring alpine species: do species partition by nitrogen form? *Oecologia* **130**:609-616.
- Miller, A. J. and M. D. Cramer. 2005. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant And Soil* **274**:1-36.
- Miller, R. M., S. P. Miller, J. D. Jastrow, and C. B. Rivetta. 2002. Mycorrhizal mediated feedbacks influence net carbon gain and nutrient uptake in *Andropogon gerardii*. *New Phytologist* **155**:149-162.
- Orwin, K. H., S. M. Buckland, D. Johnson, B. L. Turner, S. Smart, S. Oakley, and R. D. Bardgett. 2010. Linkages of plant traits to soil properties and the functioning of temperate grassland. *Journal Of Ecology* **98**:1074-1083.
- Pakeman, R. J. 2011. Functional diversity indices reveal the impacts of land use intensification on plant community assembly. *Journal Of Ecology* **99**:1143-1151.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**:158-&.

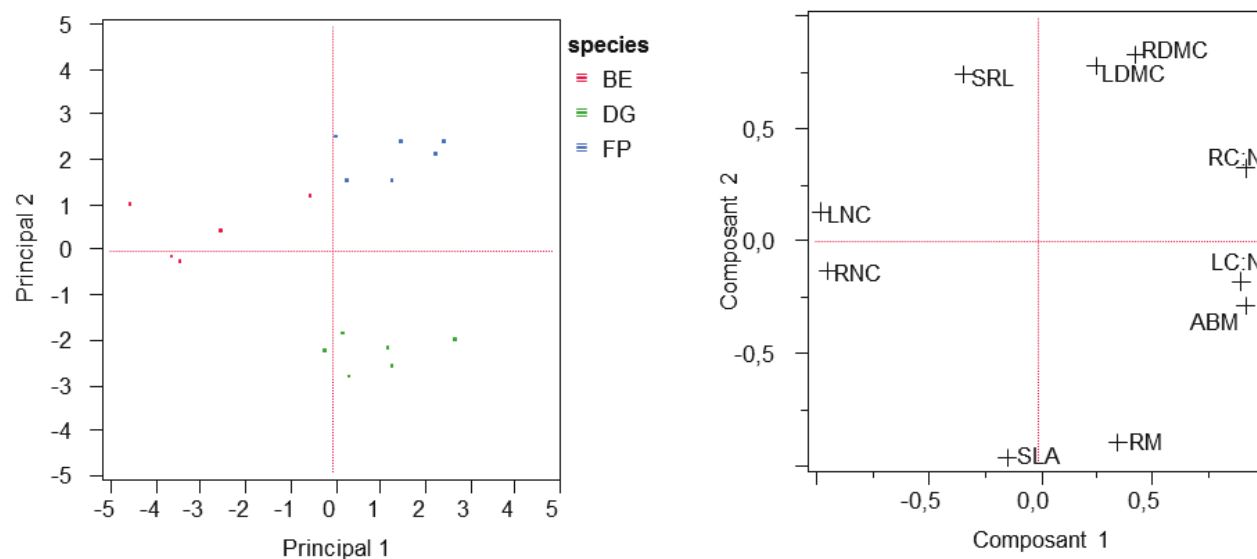
- Phillips, R. P., E. S. Bernhardt, and W. H. Schlesinger. 2009. Elevated CO₂ increases root exudation from loblolly pine (*Pinus taeda*) seedlings as an N-mediated response. *Tree Physiology* **29**:1513-1523.
- Porazinska, D. L., R. D. Bardgett, M. B. Blaauw, H. W. Hunt, A. N. Parsons, T. R. Seastedt, and D. H. Wall. 2003. Relationships at the aboveground-belowground interface: Plants, soil biota, and soil processes. *Ecological Monographs* **73**:377-395.
- Quetier, F., A. Thebault, and S. Lavorel. 2007. Plant traits in a state and transition framework as markers of ecosystem response to land-use change. *Ecological Monographs* **77**:33-52.
- Robinson, D., A. Hodge, B. S. Griffiths, and A. H. Fitter. 1999. Plant root proliferation in nitrogen-rich patches confers competitive advantage. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **266**:431-435.
- Skiba, M. W., T. S. George, E. M. Baggs, and T. J. Daniell. 2011. Plant influence on nitrification. *Biochemical Society Transactions* **39**:275-278.
- Standing, D., E. M. Baggs, M. Wattenbach, P. Smith, and K. Killham. 2007. Meeting the challenge of scaling up processes in the plant-soil-microbe system. *Biology And Fertility Of Soils* **44**:245-257.
- Trouvelot, A., J. C. Fardeau, C. Plenchette, S. Gianinazzi, and V. Gianinazzapearson. 1986. Nutritional balance and symbiotic expression in mycorrhizal wheat. *Physiologie Vegetale* **24**:300-300.
- Vale, M., C. Nguyen, E. Dambrine, and J. L. Dupouey. 2005. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. *Soil Biology & Biochemistry* **37**:2329-2333.
- van der Heijden, M. G. A., R. D. Bardgett, and N. M. van Straalen. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**:296-310.
- Vance, E. D., P. C. Brookes, and D. S. Jenkinson. 1987. An Extraction Method For Measuring Soil Microbial Biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry* **19**:703-707.
- Wardle, D. A. 1992. A comparative-assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen level in soil. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **67**:321-358.
- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. van der Putten, and D. H. Wall. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**:1629-1633.

- Wardle, D. A., G. M. Barker, K. I. Bonner, and K. S. Nicholson. 1998. Can comparative approaches based on plant ecophysiological traits predict the nature of biotic interactions and individual plant species effects in ecosystems? *Journal Of Ecology* **86**:405-420.
- Wardle, D. A., G. W. Yeates, W. Williamson, and K. I. Bonner. 2003. The response of a three trophic level soil food web to the identity and diversity of plant species and functional groups. *Oikos* **102**:45-56.
- Waring, S. A. and J. M. Bremner. 1964. Ammonium production in soil under waterlogged condition as index of nitrogen availability. *Nature* **201**:951-&.
- Wienhold, B. J. 2007. Comparison of laboratory methods and an in situ method for estimating nitrogen mineralization in an irrigated silt-loam soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **38**:1721-1732.
- Wright, I. J., P. B. Reich, M. Westoby, D. D. Ackerly, Z. Baruch, F. Bongers, J. Cavender-Bares, T. Chapin, J. H. C. Cornelissen, M. Diemer, J. Flexas, E. Garnier, P. K. Groom, J. Gulias, K. Hikosaka, B. B. Lamont, T. Lee, W. Lee, C. Lusk, J. J. Midgley, M. L. Navas, U. Niinemets, J. Oleksyn, N. Osada, H. Poorter, P. Poot, L. Prior, V. I. Pyankov, C. Roumet, S. C. Thomas, M. G. Tjoelker, E. J. Veneklaas, and R. Villar. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* **428**:821-827.

Table 2. (a) Plant biomass and functional traits, (b) soil inorganic nitrogen (N) concentration and (c) soil microbial properties for each soil treatment condition. Data from all pots per treatments were pooled to give mean values (n=3) followed by standard error (SE).

	Dactylis glomerata				Bromus erectus				Festuca paniculata			
	Sterilised soil		Non-sterilised soil		Sterilised soil		Non-sterilised soil		Sterilised soil		Non-sterilised soil	
	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N
a) Plant biomass and functional traits												
Above-ground biomass (g)	2.8 (0.2)	3.7 (0.5)	2.4 (0.1)	2.6 (0.3)	1.3 (0.1)	1.5 (0.1)	1.1 (0.1)	0.8 (0.1)	2.0 (0.2)	2.6 (0.2)	2.1 (0.3)	2.2 (0.2)
Root biomass (g)	1.61 (0.15)	2.25 (0.25)	1.77 (0.04)	1.93 (0.12)	1.18 (0.31)	1.49 (0.10)	1.09 (0.10)	0.70 (0.15)	0.35 (0.09)	0.68 (0.04)	0.62 (0.13)	0.73 (0.07)
Leaf dry matter content (mg. g ⁻¹ biomass)	318.9 (5.3)	292.0 (11.1)	293.8 (3.0)	318.7 (5.0)	323.2 (17.8)	353.0 (3.0)	347.4 (11.2)	314.9 (8.7)	397.9 (4.6)	348.5 (3.8)	354.1 (9.9)	340.1 (13.8)
Leaf N concentration (mg. g ⁻¹ biomass)	2.2 (0.2)	2.4 (0.1)	1.7 (0.1)	1.8 (0.3)	3.0 (0.3)	3.2 (0.1)	2.6 (0.2)	3.5 (0.2)	2.4 (0.2)	2.1 (0.1)	1.7 (0.2)	1.9 (0.1)
Leaf C:N ratio	21.4 (2.7)	18.6 (0.7)	27.3 (0.8)	26.3 (5.6)	15.5 (0.9)	14.8 (0.1)	17.9 (1.2)	13.6 (0.7)	19.2 (1.6)	21.7 (1.3)	27.3 (2.8)	22.6 (0.9)
Root N concentration (mg. g ⁻¹ biomass)	0.83 (0.01)	0.84 (0.01)	0.84 (0.05)	0.89 (0.04)	1.65 (0.51)	1.85 (0.01)	1.04 (0.21)	1.68 (0.05)	0.79 (0.02)	0.65 (0.05)	0.69 (0.06)	0.72 (0.03)
Root C concentration (mg. g ⁻¹ biomass)	42.6 (0.7)	43.1 (1.2)	42.9 (0.3)	43.8 (1.2)	41.8 (0.8)	35.6 (0.2)	41.6 (3.6)	41.1 (1.3)	43.9 (0.5)	45.2 (1.1)	45.8 (0.4)	45.6 (0.2)
Root C:N ratio	51.5 (0.8)	51.4 (1.5)	51.7 (2.9)	49.8 (3.2)	29.7 (7.1)	19.2 (0.2)	40.7 (4.9)	24.53 (1.4)	55.5 (2.1)	70.9 (6.7)	67.5 (6.23)	63.5 (2.2)
Root dry matter content (mg. g ⁻¹ biomass)	166.4 (15.8)	184.6 (10.9)	155.2 (4.1)	153.9 (7.3)	156.7 (8.5)	174.2 (4.2)	164.8 (20.4)	165.9 (7.2)	170.4 (20.3)	220.7 (6.4)	210.1 (3.4)	209.8 (9.2)
b) Soil inorganic N concentration												
Soil N-NO ₃ ⁻ concentration (µg. g ⁻¹ dry soil)	6.62 (3.2)	3.93 (1.8)	0.07 (0.05)	3.74 (3.2)	23.54 (2.4)	18.76 (4.5)	19.29 (3.4)	68.64 (17.1)	23.24 (4.7)	29.83 (3.7)	39.49 (5.9)	41.28 (6.9)
Soil N-NH ₄ ⁺ concentration (µg. g ⁻¹ dry soil)	26.6 (1.6)	25.1 (0.9)	25.41 (1.2)	25.89 (2.6)	45.7 (5.9)	37.7 (0.2)	26.6 (0.9)	39.9 (6.9)	61.5 (5.3)	58.3 (3.7)	25.3 (2.4)	35.7 (7.3)
c) Microbial properties												
DEA (µg N-N ₂ O .g ⁻¹ sol sec .h ⁻¹)	0.15 (0.04)	0.20 (0.08)	0.40 (0.02)	0.45 (0.02)	0.13 (0.02)	0.28 (0.05)	0.31 (0.02)	0.28 (0.01)	0.16 (0.02)	0.29 (0.03)	0.37 (0.04)	0.33 (0.02)
NEA (µg N-N ₂ O+N-NO ₃ .g ⁻¹ sol sec .h ⁻¹)	nd	nd	0.09 (0.03)	0.12 (0.03)	nd	nd	0.13 (0.05)	0.20 (0.08)	nd	nd	0.29 (0.07)	0.60 (0.27)
Mycorrhizal frequency (%)	nd	nd	73.4 (12.3)	73.2 (2.2)	nd	nd	60.8 (5.8)	57.0 (17.3)	nd	nd	92.4 (5.6)	88.4 (6.7)
Mycorrhizal root colonisation (%)	nd	nd	13.5 (7.7)	14.7 (4.2)	nd	nd	9.7 (1.6)	12.5 (8.1)	nd	nd	40.9 (7.9)	32.7 (13.2)

Appendix 1: Principal components analysis (PCA) of plant functional traits and properties of the three species, in non-sterilized soil. Abbreviations : aboveground biomass (ABM), root biomass (RM), specific leaf area (SLA), leaf nitrogen concentration (LNC), leaf dry matter content (LDMC), leaf C:N ratio (LC:N), specific root length (SRL), root nitrogen concentration (RNC), root dry matter content (RDMC) and root C:N ratio (RC:N).



Conclusion du chapitre 3

L'expérimentation à l'échelle de l'individu pour les 3 espèces de graminées du Lautaret a permis d'identifier des traits fonctionnels impliqués dans les relations avec les propriétés microbiennes du sol. Nous avons déterminé quelles étaient les effets des traits de plantes sur les activités bactériennes du sol et la colonisation mycorhizienne en faisant varier la disponibilité des ressources azotées du sol que ces deux groupes peuvent assimiler.

L'utilisation d'espèces végétales à stratégies d'acquisition et d'utilisation des ressources contrastées nous a permis d'identifier les traits fonctionnels végétaux impliqués dans les relations plantes-microorganismes du sol. Dans un premier temps, nous avons montré que la dénitrification potentielle (DEA) et le taux de colonisation mycorhizienne variaient significativement dans les sols de deux des espèces étudiées. Dans le sol de *D. glomerata*, nous avons observé que la DEA est la plus élevée pour une quantité en nitrate faible alors que dans le sol de *F. paniculata*, la DEA est la plus faible avec une quantité en nitrate plus élevée. Ces résultats suggèrent une compétition pour les nutriments entre les microorganismes du sol et les plantes, dont l'intensité varie en fonction de l'espèce végétale étudiée. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'en présence de microorganismes dans le sol (chapitre 3 – effet stérilisation), les rapports C:N des feuilles et des racines augmentent chez toutes les espèces, suggérant une limitation en nutriment, mais aussi une augmentation de la photosynthèse couplée à une plus forte allocation de C dans les racines. En réponse à cette limitation, deux des espèces étudiées montrent deux stratégies différentes pour prospecter le sol puisque cette allocation de C se traduit soit par une augmentation de la biomasse racinaire chez l'espèce la plus exploitatrice (*D. glomerata*), soit par une augmentation de l'intensité de la mycorhization chez la plus conservatrice (*F. paniculata*) qui produit le moins de biomasse racinaire. Cette différence de production de biomasse expliquerait également les différences de DEA dans le sol sous ces deux espèces végétales. En effet, une forte production de biomasse suggère une forte exsudation de composés carbonés dans le sol pouvant stimuler l'activité des microorganismes hétérotrophes comme les dénitrifiants. Alors qu'à l'opposé, une biomasse racinaire faible limite l'exsudation de composés carbonés dans le sol et donc l'activité des microorganismes hétérotrophes. Cette suggestion est supportée par les résultats obtenus avec l'expérimentation présentée en annexe de ce chapitre, qui montrent que l'exsudation de C est supérieure chez les espèces produisant les plus fortes biomasses racinaires. Cette exsudation

de composés carbonés permet de stimuler les microorganismes hétérotrophes du sol et donc la minéralisation de l’N par dégradation de la matière organique. Ainsi, les microorganismes dénitrifiants profiteraient de cette source de C soluble pour augmenter leurs activités, ce qui intensifie au moins à court terme la compétition pour le nitrate avec les plantes.

Ainsi, les traits racinaires et notamment la biomasse de racine reflèteraient deux stratégies de prospection du sol. D'un côté les espèces plutôt exploitatrices comme *Dactylis glomerata* privilégient une forte production de biomasse pour prospecter le sol. Cette production intense de biomasse entraîne un taux d'exsudation de C important pour stimuler la minéralisation de l’N mais aussi la compétition avec les microorganismes hétérotrophes à court terme. A l’opposé, les espèces plutôt conservatrices comme *Festuca paniculata* produisent moins de racines mais plus denses, ce qui favorise la colonisation par les mycorhizes arbusculaires pour prospecter le sol et augmenter leur acquisition d’N. Ces espèces plus conservatrices, investiraient donc plus leur C dans le symbiote mycorhizien, limitant l'exsudation de C dans le sol et donc l'activité des microorganismes hétérotrophes du sol (Fig. 1).

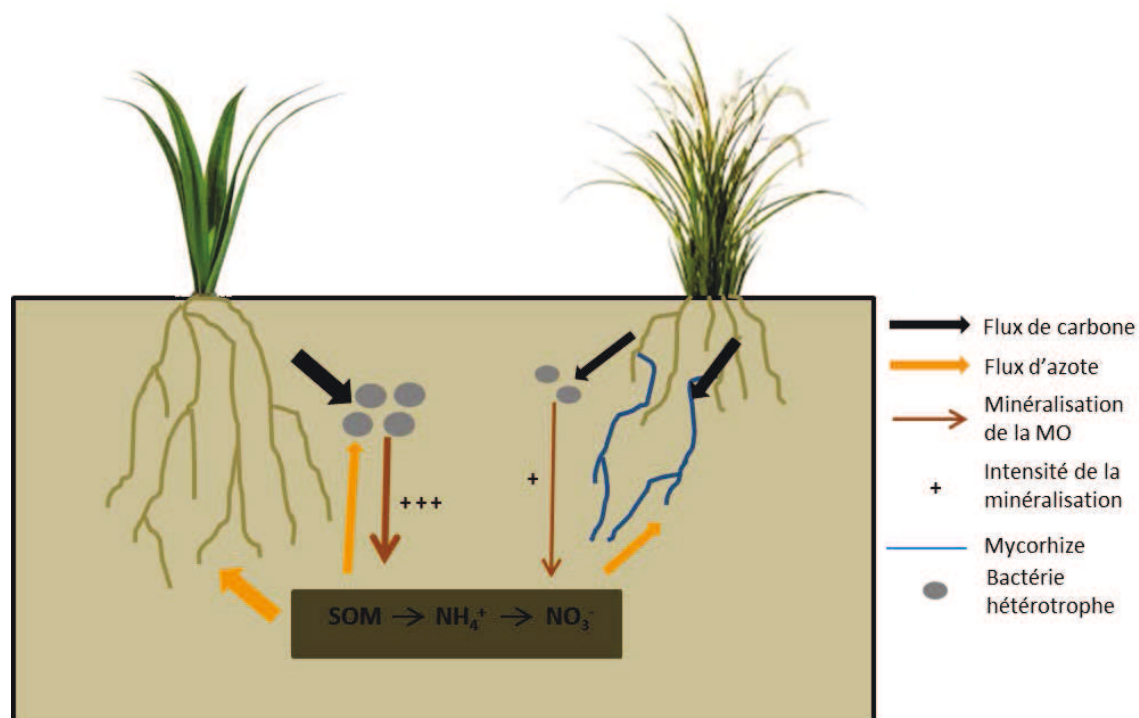


Figure 2 : Schéma synthétique des mécanismes fins des relations plante-microorganismes chez une espèce exploitatrice (à gauche) et une espèce conservatrice (à droite) L'espèce exploitatrice produit une forte biomasse racinaire pour prospecter le sol et exsude une quantité importante de C pour stimuler la minéralisation de l'azote par les microorganismes hétérotrophe du sol. L'espèce conservatrice investit son C dans la symbiose mycorhizienne pour prospecter le sol et augmenter son acquisition en azote.

A travers ces deux études sur les effets de la disponibilité en N du sol, nous avons démontré que les traits fonctionnels végétaux, et notamment les traits racinaires pouvaient être de bons marqueurs des mécanismes fins de réponses des plantes et de leurs effets sur les communautés microbiennes du sol. Cependant, il est important de noter que ces observations sont le résultat d'études sur seulement 3 ou 4 espèces et sur des plantes jeunes (3 mois), et nécessite une confirmation sur des pas de temps plus long et sur une plus grande gamme d'espèces.

Les résultats et les conclusions tirés de ce chapitre proviennent d'analyses exploratoires qui nécessiteront d'être approfondies. De plus, des données complémentaires permettront ultérieurement de détailler les effets des traits fonctionnels végétaux sur la structure des communautés microbiennes.

Article annexe

**Rhizodeposition of organic carbon by plants with contrasting
traits for resource acquisition**

**BAPTIST F, ARANJUELO I, LEGAY N, LOPEZ SANGIL L, MOLERO G, BA
FORNE S, Pere R, NOGUES S**

In preparation for *Journal of Experimental Botany*

Abstract

Rhizodeposition is believed to play an important role in mediating soil nutrient availability in ecosystems. However, owing to methodological difficulties (i.e. narrow zone of soil around roots and rapid assimilation by soil microbes), variations of rhizodeposition between plant species or in response to various environmental variables, such as fertility regime, remain mostly unknown.

In this study, we developed a continuous ^{13}C labelling method that allowed (1) homogenous labelling and (2) the separation of plant-derived $\text{CO}_2\text{-C}$ from microbial-derived $\text{CO}_2\text{-C}$ in order to address the effects of two fertility levels on rhizodeposited C by plants characterized by contrasted nutrient acquisition strategy. Experimental controls demonstrated that most of the biases related to the nature of experiment (steady state long term labelling) were avoided.

Our results showed that C rhizodeposition was not related to leaf functional traits and thus did not reflect differences between species according to their plant nutrient economics. Differences between species were mostly related to their root morphology, with higher total rhizodeposited C in species with higher total root biomass and higher specific rhizodeposited C (per gram of root) for species with lower root nitrogen concentration. Moreover, changes in rhizodeposition patterns with fertilisation were modulated by root responses to different nutrient availabilities.

Collectively these results suggest that the amount of C rhizodeposited under different levels of nutrient availability were driven mainly by root morphology rather than leaf characteristics, and were more dependent of species identity than on the leaf economic spectrum.

Key words : Plant nutrient use strategies, root traits, leaf traits, nutrient, exudation, nitrogen.

Introduction

The availability and management of nitrogen (N) and water is a major determinant of plant performance in natural and agro-ecosystems (Passioura, 2002; Cossani *et al.*, 2007). In natural ecosystems, the availability of nutrients to plants depends to a large extent on the heterotrophic microbial activity, a target process in the net mineralization of the soil organic matter (Molina & Smith, 1998; Norton, 1999; Valé *et al.*, 2005). Because in natural ecosystems plant growth is tightly linked to microbial activity, soil nutrient cycling will be also mediated by plant C provision to the soil microbiota. Briefly, microbes transform soil organic matter and release mineral elements into labile forms available to plants. In turn, the microbes mediating these processes, and the rates at which they mineralise, depend to a large extent on inputs of C from the plants growing in the soil (Paterson, 2003). Rhizodeposition, that is to say the release of carbohydrates, carboxylic acids and amino acids by plant roots, represent up to 40% of net photosynthates loss by plants (Whipps, 1990; Meharg, 1994). Consequently, it is believed that plant derived photoassimilates play a prime role in influencing nutrient availability in the rhizosphere and thus plant growth itself (Lynch, 1990; Marschner, 1995). Although plant exudation has been largely studied during the last few years, methodological difficulties such as the investment of photoassimilates in root and bacteria respiration processes, or the narrow zone of soil around roots and rapid assimilation by soil microbes, have limited the further understanding of photosynthate exudation and further processing by soil microbiota (Dilkes *et al.*, 2004).

Amounts and quality of compounds released from roots differ across plant species and even genotypes (e.g. crop varieties), and depend on abiotic/biotic factors (Rovira, 1969; Dakora & Phillips, 2002). Soluble exudates (mostly composed by simple sugars), account for 1 to 10% of C rhizodeposition (Paterson, 2003; Jones *et al.*, 2004). Root exudates, together with other rhizodeposits, provide carbohydrates (and possibly nitrogen, Lesuffleur & Cliquet, 2010) required by the soil microbiota (Merbach *et al.*, 1999; Paterson, 2003; Jones *et al.*, 2004) for the mineralization of soil organic N (Kuzyakov *et al.*, 2000). Although mineralized N would initially be incorporated into the microbial biomass, such N is ultimately available to plant roots due to rapid microbial turnover (relative to roots) (Schmidt *et al.*, 2007). Environmental conditions will modulate the symbiotic relationship between the plants and the soil microbiota. It is expected that the exudation of plants with resource-use exploitative strategy) will be stimulated in order to favour soil N mineralization (Van der Krift *et al.* 2001). Similarly rhizosphere microbial activity are expected to be higher for plant species that have high root exudation rates, rapid growth (important flux of photoassimilates) and a small

amount of root structural C (which may limit the passive diffusion of exudates through the root tissues) (Valé *et al.* 2005). Even if plant-microbiota symbiotic relationships favour the development of each of these partners, it is also true that under limited resource conditions plant and soil microbiota compete for available resources such as soil N. Ultimately, exudation may reduce N-acquisition by roots, at least around roots (Jones *et al.* 2004), because of competitive interactions for inorganic N between active microbial community and plant roots (Kuzakov & Xu, 2013).

The role for rhizodeposition of soil nutrient availability has been previously addressed for plants with contrasted nutrient economies (Warembourg *et al.*, 2003) and plants grown under different fertility conditions (Johansson, 1992; Denef *et al.*, 2009). However, the results of such studies have proved highly variable, with strong discrepancies in their conclusions. For instance, in studies conducted in hydroponics and axenic sand culture systems, the loss of C per unit weight of root was observed to increase at low N-supply (Paterson & Sim, 1999, 2000). However, those studies did not clarify whether this was due to altered exudation intensity from the whole root, or due to exudation from sites which are more abundant and active under low N supply (e.g. junctions of lateral roots and root tips). On the other hand, other studies carried out with soil, the effects of N fertilisation on rhizodeposition were inconclusive with both positive and negative effects of low N supply on rhizodeposition (Nicol *et al.*, 2003, Jones *et al.*, 2004; Denef *et al.* 2009).

In this study, we aimed to elucidate the effects of two fertility levels on rhizodeposited C and its transfer to soil microbiota by four perennial grass species from semi-natural grasslands characterized by contrasted nutrient acquisition strategies. These included two exploitative species, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, and two conservative species, *Anthoxanthum odoratum* and *Briza media*. In order to estimate total rhizodeposited C by these species, we applied a continuous ^{13}C labelling protocol that allowed (1) homogenous labelling and (2) the separation of plant-derived $\text{CO}_2\text{-C}$ from microbial-derived $\text{CO}_2\text{-C}$. Plants were labelled until steady state was reached. This allowed us to quantify C assimilation and partitioning towards soil and microbial biomass.

Material and methods

Plant culture

The species selected for this study were *Dactylis glomerata* (DG), *Lolium perenne* (LP), *Anthoxanthum odoratum* (AO) and *Briza media* (BM), all from the Poaceae family. *Dactylis glomerata* and *Briza media* were collected from adult tussocks during July 2009 at the Lautaret pass (French Alps, 2000 m a.s.l., 45° 4' N - 6°34' E), *Lolium perenne* and *Anthoxanthum odoratum* were collected from adult tussocks in an English grassland (54°18' N - 2°5' W) during the same period. After reception, plants were immediately transplanted into pots and subsequently separated into individual ramets. On each ramet, roots and leaves were cut at 5-cm from the base and planted alone in the pot. We used a sandy grassland topsoil (0–30-cm) collected at the Helmholtz Zentrum experimental station in Scheyern (Germany), with a sandy soil texture (7.6% clay, 10.3% of silt and 82.1% sand). A total of 22 pots per species were set up and placed in two controlled-environment chambers (Convion E15, Controlled Environments Ltd., Winnipeg, Manitoba, Canada) until the 2nd of November. In both growth chambers the photoperiod was 10h, and mean air temperatures day / night were 25°C / 18°C, with a relative air humidity maintained at 46%. All replicates were watered each day at 70% of soil water holding capacity. In order to test the functioning of soil microbiota alone, 18 pots without plants (“bare soil”) were placed parallel to the pots with plants. Watering and N fertilisation were applied following the same protocol used for plants. In order to avoid any algal development, dark circle paper with hole in the center was added to each pot.

Fertility treatment

Eleven replicates of each species were N-fertilised (100 kg N ha⁻¹), whereas the other half received a solution without nitrogen (0 kg N. ha⁻¹) but containing similar concentrations of phosphorus and microelements to avoid any deficiencies. This fertilisation treatment aimed to simulate the higher level of fertility found in the grasslands where plant species were collected. The supply of chemical fertiliser (with and without nitrogen) was provided in two applications, on the 30/10/09 and on the 06/11/09. For fertilised plants, it corresponded to the supply of 40kg N ha⁻¹ and 60kg N ha⁻¹ respectively.

Labelling procedure

In order to measure rhizodeposited ¹³C, we conducted a steady state labelling in ¹³CO₂ enriched atmosphere. The labeling procedure lasted in total 79 days, from the 2nd of November until the 20th of January 2010. Sixteen replicates per species (n=4 per fertilisation

level) and twelve ‘bare ground’ pots ($n=3$ per fertilisation level) were placed in the growth chamber with ^{13}C -labelled atmosphere (total of 82 pots). A 50-ml syringe (SGE, Ringwood, Australia) and a needle (model microlance 3, BD, Plymouth, UK) was filled each day and placed on a syringe pump which delivered 6 ml h^{-1} of $^{13}\text{CO}_2$ (99.9%). This system allowed a homogeneous labelling throughout the day. Although InfraReg Gas analyzer does could detect $^{13}\text{CO}_2$, calculus indicated that, given the CO_2 injected by the syringe pump and the volume of the growth chamber, the total concentration of CO_2 in the growth chamber, without taking into account plants gas fluxes, was 410-ppm. Based on InfraRed Gas analyzer measurements, $^{13}\text{CO}_2$ concentration varied from 300 to 500ppm during the day depending on plant gas exchange activity (see appendix 2). Isotopic composition of atmospheric CO_2 in the growth chamber reached 200 to 300 ‰ during the day (see Appendix 2). During the night, no ^{13}C - CO_2 was injected.

Six replicates per species ($n=3$ per fertilisation level) and six “bare ground” pots ($n=3$ per fertilisation level) were considered as control samples and grown during the whole experiment in another growth chamber with unlabelled atmosphere (total of 30 pots).

Plant and soil sampling

In the growth chamber with ^{13}C -labeled atmosphere, 8 replicates per species and 6 “bare ground” pots were harvested on the 11th of January 2010 (t_i see appendix 1), and the remaining pots seven days later, the 20th January (t_f). In growth chamber with unlabelled atmosphere, all pots (with and without plants) were sampled the same day on the 21st of January.

All replicates (with and without plants from ^{13}C -labelled and unlabelled atmospheres) were processed following the same experimental procedure (see below).

For each pot, the whole plant was removed from soil and gently handshaken in order to recuperate most of the soil adhered to the roots. Roots and leaves were then separated. In parallel, soil was sieved at 2-mm in order (1) to homogenize it and (2) to remove remaining root fragments. These root fragments were pooled with their respective root samples. Leaf samples were dried at 60°C during at least 48h, weighed and ground. Root samples were washed, and separated into two pools: half of the biomass was immediately frozen and later used for total and labile C analyses, whereas the rest was enclosed for 5 min in a 0.4L-Perspex chamber to measure root CO_2 effluxes and the isotopic signature of dark-respired $^{13}\text{CO}_2$. Root CO_2 effluxes were estimated every minute for 10–15 min by enclosing them in a dark 0.4L-Perspex© chamber connected to an IRGA model Li-6200 (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA).

Afterwards, the 0,4L-chamber connected to the Li-6200 IRGA was flushed with CO₂-free air to ensure that only the CO₂ respired in the chamber was measured. CO₂ was then allowed to accumulate up to a concentration of 600-1000-ppm, and then, in order to measure the isotopic signature of dark-respired ¹³CO₂, air samples were collected using the above mentioned 50 ml syringe and needle. The gas samples were passed through a magnesium perchlorate column (water vapour trap), then immediately injected into a 10-ml vacutainer (BD vacutainer, Plymouth, UK) as previously described (Aranjuelo *et al.*, 2008). To avoid contamination with the air present in the syringe and needle, both were flushed with N₂ before taking each sample. The vacutainers were also overpressurized with N₂, so the pressure inside the vacutainer was above the ambient pressure. After gas sampling, the roots were then dried at 60°C during 48h and weighed.

Soil analyses

After sieving, 220-g of soil DW was separated into 5 pools. Two aliquots of twenty grams of soil FW were placed a few hours in a fridge before C and N measurements (see procedure below). Twenty grams of soil were dedicated to soil relative humidity and pH measurements (see procedure below). Finally, 20-g of soil FW were used to estimate soil CO₂ effluxes and the isotopic signature of respired ¹³CO₂. The procedure was similar to root CO₂ efflux measurements (see above). Soil water content and pH_{H2O} were determined following standard methods (Robertson *et al.*, 1999). Nitrogen was extracted from fresh soil samples with 0.5 M K₂SO₄. These extracts were analysed for ammonium (NH₄⁺) and nitrate (NO₃⁻) contents using a FS-IV colorimetric chain (OI-Analytical, College Station, TX, USA).. Total soluble C in the soil was estimated by injecting 1-ml of soil extracts in a HPLC coupled to a mass spectrometer. In order to estimate C microbial biomass and NH₄⁺ and NO₃⁻ immobilized by microbial biomass, fresh soil samples were fumigated for 24h with chloroform. After 24h, these soil samples were extracted with 0.5 M K₂SO₄ and analyzed following the same procedure as described above.

Total NH₄⁺ and NO₃⁻ immobilized in microbial biomass between t_f and t_i was calculated as the difference between NH₄⁺ or NO₃⁻ immobilized in microbial biomass at t_f and t_i.

Isotope labelling calculations

To estimate ¹³C enrichment in leaf, root and soil samples, %Atom (¹³C proportion) for ¹³C was calculated using the following equation:

$$\%Atom = \frac{\delta + 1000}{\delta + 1000 + \frac{1000}{R_{standard}}}$$

where δ is the isotopic signature of CO₂ respired or of leaf and root samples. $R_{standard}$ is the international standard reference (i.e. ¹³C/¹²C, PeeDee Belemnite).

%Atom excess was then calculated as the %Atom ¹³C differences between labelled and unlabelled organs/soil samples (from control pots in unenriched atmosphere, see appendix 1):

$$\%Atom\ excess = Atom\%_{labelled} - Atom\%_{unlabelled}$$

The labelling-derived ¹³C content ($\gamma^{13}C$, in $\mu g^{13}C$) in each organ of the plant and in soil was calculated as follows:

$$\gamma^{13}C = \%Atom\ excess \cdot \%C_{organ} \cdot mass_{organ}$$

where %C is the percentage of carbon in the organ or in soil.

The labelling-derived ¹³C flux associated with root and soil respiration ($\gamma^{13}C$, in $\mu g^{13}C\ g^{-1}\ DW$) was calculated as follows:

$$\gamma^{13}C_R = \frac{\%Atom\ excess \cdot R_{organ}}{mass_{organ}}$$

where $mass_{organ}$ is the mass of the organ (g) considered, R_{organ} is the respiration rate and %Atom excess is the ¹³C atom excess in CO₂.

The differences in ¹³C microbial biomass between t_f and t_i and the integration of ¹³C respired by the microorganisms during this time period gave total rhizodeposited ¹³C per day for each species under both fertilisation levels.

$$\int_{t_i}^{t_f} {}^{13}C_{rhizodeposited} = \frac{\int_{t_i}^{t_f} {}^{13}\gamma^{13}C_{microbial\ biomass} + \int_{t_i}^{t_f} \gamma^{13}C_{soil} + \int_{t_i}^{t_f} \gamma^{13}C_{roots}}{\Delta t}$$

Lastly, Sspecific rhizodeposited ¹³C was calculated as the total rhizodeposition ¹³C divided by root biomass (DW).

Statistical analyses

For all data, a three way ANOVA was performed in order to test for the effects of N fertility, species and time (t_i and t_f) effects. Analyses relating rhizodeposition parameters to plant traits used linear regressions. All analyses were performed with Jump software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Controls

Was steady-state labeling reached?

Results presented in Appendix 3 demonstrate that, although isotopic composition of leaves displayed significant differences between t_i and t_f , the isotopic composition of roots was similar between these two dates. In contrast, root isotopic composition differed significantly between species with a lower value for AO (on average 238‰) compared to the other species (on average 276‰) (Appendix 3), whereas there were no difference across species in leaf isotopic composition.

Does microbial biomass fix directly ^{13}C through PEP-Carboxylation ?

No direct ^{13}C carboxylation by microbial biomass was observed in this experiment (Appendix 4). Indeed, the isotopic composition of extractable soil C and microbial biomass in “bare soil” pots were similar in growth chambers with labelled and unlabelled atmosphere. Only microbial biomass from pots with plants displayed enriched ^{13}C .

Is ^{13}C respired by the microorganisms correlated to ^{13}C accumulated in microbial biomass?

Results displayed a strong correlation between ^{13}C respired by microorganisms and ^{13}C accumulated in microbial biomass ($R^2=0.55$, $P<0.0001$, see Appendix 5).

Plant characteristics

Total biomass, leaf and root biomasses differed significantly between species. The observed ranking, $\text{DG} > \text{LP} > \text{AO} = \text{BM}$, mainly reflected variations in root biomass (Table 1 and 2). LP had a root/shoot ratio significantly greater than the other species (1.53 vs. 0.88 in average for the other three species). In contrast to biomass, leaf and root N contents varied slightly but significantly between species (Table 1 and 2), BM being characterized by the highest values. Although fertilisation had no significant effect in plant N content, only affected biomass data (Table 1 and 2). N fertilisation leads to a general increase of 22% in total biomass, 12% being due to leaf biomass increase.

The species \times fertility interaction was significant for all biomass parameters ($P<0.001$). Indeed, in contrast to DG and AO, BM experienced a reduction in leaf and root biomass in response to N fertilisation. LP showed an increase in leaf biomass but a decrease in root biomass in response to N fertilisation.

Table 1. Responses of plant traits to fertilisation treatments without (-N) or with nitrogen addition (+N). Data from all pots per treatments were amalgamated to give mean values (n=4) followed by standard error (SE).

Species	Abbr.	Total biomass (g DW)		Leaf biomass (g DW)		Root biomass (g DW)		Leaf N content (% DW)		Root N content (% DW)	
Fertility level		-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N
<i>Dactylis</i>	DG	0.87	1.53	0.74	0.82	0.34	0.78	1.63	1.51	0.76	0.62
<i>glomerata</i>		(0.09)	(0.04)	(0.1)	(0.08)	(0.03)	(0.09)	(0.14)	(0.04)	(0.03)	(0.03)
<i>Lolium</i>	LP	0.75	0.77	0.28	0.40	0.53	0.44	1.70	2.00	0.65	0.78
<i>perenne</i>		(0.06)	(0.05)	(0.02)	(0.01)	(0.04)	(0.10)	(0.05)	(0.10)	(0.03)	(0.03)
<i>Anthoxantum</i>	AO	0.29	0.67	0.14	0.36	0.15	0.31	1.71	1.51	0.86	0.80
<i>odoratum</i>		(0.07)	(0.06)	(0.04)	(0.03)	(0.02)	(0.03)	(0.17)	(0.20)	(0.04)	(0.03)
<i>Briza media</i>	BM	0.64	0.60	0.40	0.38	0.26	0.22	1.71	2.35	0.92	1.21
		(0.15)	(0.22)	(0.06)	(0.13)	(0.09)	(0.09)	(0.12)	(0.25)	(0.09)	(0.18)

Effects of species and fertility on rhizodeposited C

Total rhizodeposited ^{13}C varied between 5 and 18 $\mu\text{g}^{13}\text{C d}^{-1}$ depending on species and fertilisation (Fig. 1a). More than 65% of rhizodeposited ^{13}C was immobilized in microbial biomass, the rest being respired by microbial biomass (Fig. 2a and b). The immobilization of ^{13}C in soil C labile represented less than 0.001% of total rhizodeposited ^{13}C (data not shown). Total rhizodeposited ^{13}C and specific rhizodeposited ^{13}C were both significantly affected by species (Table 3, Fig. 1a and b). DG had significantly higher total rhizodeposited C than LP and AO, followed by BM. In contrast, when rhizodeposition flux was expressed per g of root dry biomass, specific rhizodeposited C decreased from AO to BM, then followed by DG and LP (Table 3, Fig. 1a and b). In both cases, total variation was always less than a factor 2 between the highest and the lowest values.

Whereas fertilisation did not affect specific rhizodeposited C, its effect on total rhizodeposited C was very significant (Table 3, Fig. 1a and b). For all species together, total rhizodeposited C increased by 13% in response to N fertilisation. This effect was mainly explained by an increase in accumulated C microbial biomass (data not shown, $F_{(3,22)}=13.08$, $P=0.001$), and as a consequence, in accumulated ^{13}C microbial biomass (Table 3 and Fig. 2a and b). Indeed, ^{13}C respired by microbial biomass was not altered by fertilisation (Table 3) and variations in labile soil ^{13}C were too low to explain this effect. The species \times fertility interaction was significant for both total rhizodeposited ^{13}C and specific rhizodeposited ^{13}C . Whereas total ^{13}C rhizodeposited of DG and AO was higher with fertilisation, the opposite was observed in the case of LP and BM. Similarly, DG, LP and BM experienced lower specific ^{13}C rhizodeposited with fertilisation while AO experienced higher value.

Total rhizodeposited ^{13}C and specific rhizodeposited ^{13}C were not significantly correlated to leaf biomass and leaf traits such as leaf N content ($R^2_{\text{adj}}=0.08$; $F=3.43$; $p=0.07$ and $R^2_{\text{adj}}=0.03$; $F=0.19$; $p=0.66$ respectively).

Total rhizodeposited ^{13}C and specific rhizodeposited ^{13}C were both significantly correlated to root biomass (Fig. 3a and b). When expressed per gram of roots DW, total rhizodeposited ^{13}C was also significantly correlated to root N content (Fig. 3c). In contrast, no correlation was observed between specific rhizodeposited ^{13}C and root N content (Fig. 3d).

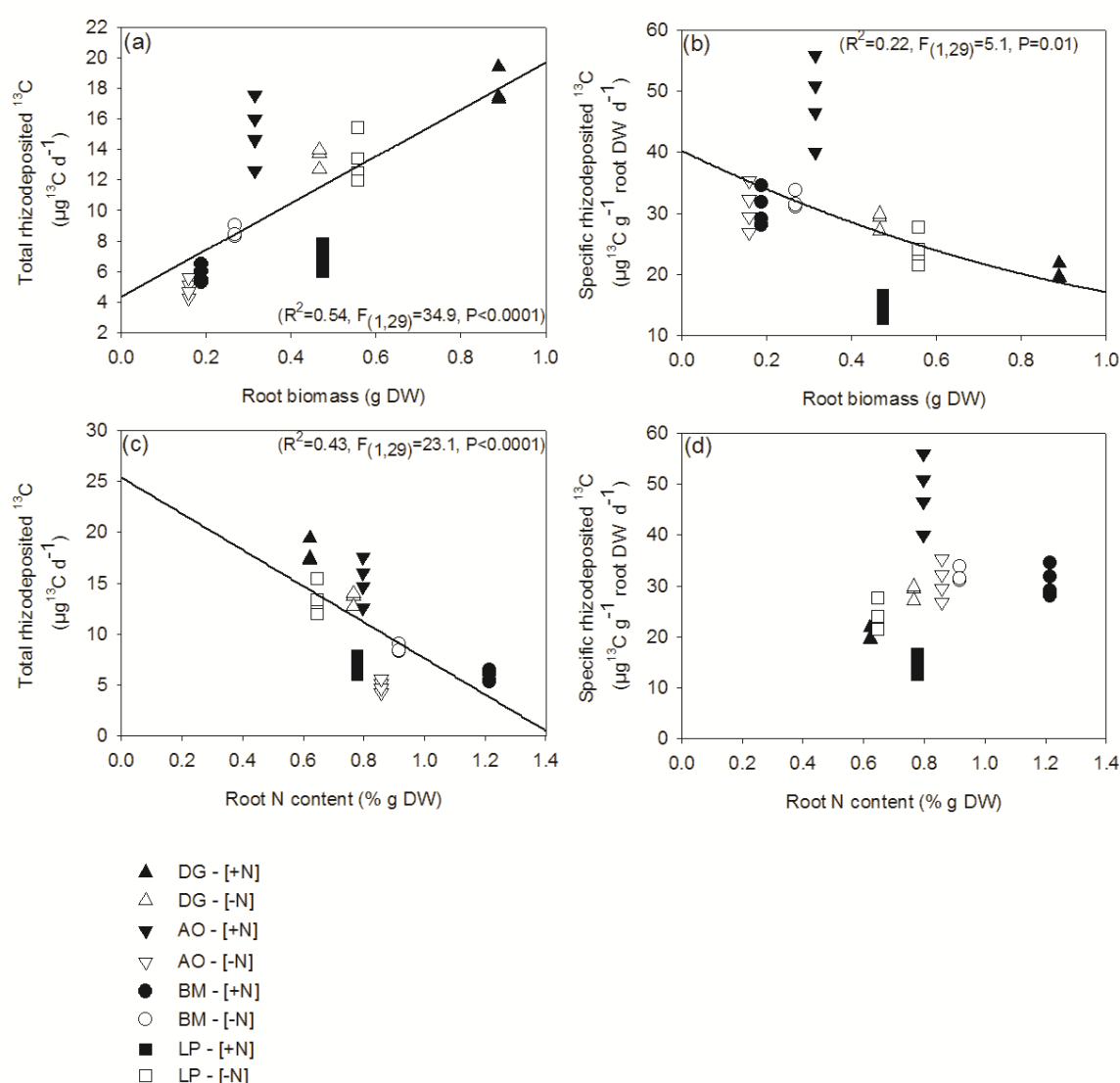


Figure 3. Correlation between total root biomass and (a) total or (b) specific rhizodeposited C, and between root nitrogen content and (c) total or (d) specific rhizodeposited C. Legends : *Dactylis glomerata* (DG), *Lolium perenne* (LP), *Anthoxanthum odoratum* (AO), *Briza media* (BM), nutrient solution without (-N) or with nitrogen addition (+N).

Table 3. Effects of species and fertilisation on rhizodeposited C and, soil microbial C assimilation and respiration. Values are results of ANOVAs (F).

Variable	Effect	F (dl)	P
Total rhizodeposited ¹³C	<i>Species</i>	66.4 (3,22)	<0.0001
	<i>Fertility</i>	10.9 (1,22)	0.0032
	<i>Species × Fertility</i>	83.2 (3,22)	<0.0001
Specific rhizodeposited ¹³C	<i>Species</i>	55.3 (3,22)	<0.0001
	<i>Fertility</i>	0.14 (1,22)	0.70
	<i>Species × Fertility</i>	27.1 (3,22)	<0.0001
¹³C accumulated in microbial biomass	<i>Species</i>	66.0 (3,22)	<0.0001
	<i>Fertility</i>	15.9 (1,22)	0.006
	<i>Species × Fertility</i>	150.1 (3,22)	<0.0001
¹³C respired by microbial biomass	<i>Species</i>	12.7 (3,22)	<0.0001
	<i>Fertility</i>	1.38 (1,22)	0.25
	<i>Species × Fertility</i>	17.1 (3,22)	<0.0001
Soil ¹³C labile	<i>Species</i>	2.55 (3,22)	0.08
	<i>Fertility</i>	5.72 (1,22)	0.03
	<i>Species × Fertility</i>	1.58 (3,22)	0.22

Table 4 Soil characteristics without (-N) or with nitrogen addition (+N). Data from all pots per treatments were amalgamated to give mean values (n=4) followed by standard error (SE). Nitrate concentration equalled zero was not presented in the table. na = not acquired.

Species	Soil NH ₄ ⁺ (μg N-NH ₄ ⁺ kg ⁻¹ soil DW)		Immobilized NH ₄ ⁺ in microbial biomass (μg N-NH ₄ ⁺ kg ⁻¹ soil DW)		C microbial biomass (μg C g ⁻¹ soil DW)		pH	
	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N
<i>Dactylis glomerata</i>	0.47 (0.05)	0.42 (0.02)	2.74 (0.15)	3.22 (0.17)	362.5 (63.7)	327.3 (85.8)	6.88 (0.02)	6.81 (0.02)
<i>Lolium perenne</i>	0.64 (0.03)	0.74 (0.03)	2.57 (0.08)	2.70 (0.08)	396.4 (94.5)	261.8 (86.2)	6.83 (0.01)	6.78 (0.03)
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	0.49 (0.03)	0.63 (0.06)	2.90 (0.08)	3.20 (0.02)	243.8 (39.2)	289.6 (90.8)	6.79 (0.01)	6.75 (0.01)
<i>Briza media</i>	0.38 (0.04)	0.33 (0.04)	2.89 (0.07)	3.02 (0.08)	279.5 (86.9)	244.8 (85.5)	6.76 (0.02)	6.69 (0.02)
Bare soil	0.46 (0.02)	0.42 (0.00)	1.80 (0.09)	1.98 (0.35)	na	na	6.54 (0.04)	6.29 (0.01)

Impact of species and fertility on soil properties

Soil NH_4^+ content and immobilized NH_4^+ in microbial biomass were highly sensitive to plant species, fertilisation and time effects (Table 4 and 5). Soil NH_4^+ content was significantly higher under LP, than under AO, DG and BM. In contrast, LP soil had lower immobilized NH_4^+ in microbial biomass compared to the other species. Whereas soil NH_4^+ content was significantly lower with fertilisation, the opposite trend was observed for immobilized NH_4^+ in microbial biomass (Table 4 and 5). Finally, soil NH_4^+ content and immobilized NH_4^+ in microbial biomass were systematically higher at t_i compared to t_f . In contrast, C microbial biomass did not respond to species or fertilisation. Nevertheless, the time effect was highly significant, with C microbial biomass being higher at t_f than at t_i . Soil pH was significantly affected by species and fertilisation (Table 5). Without plants, soil pH was lower from 0.30 to 0.50 units than with plants. Beside, soil pH was lower under BM, followed by AO, LP and DG. The variations between the lowest and the highest values were of 0.12 unit. Finally, fertilisation decreased significantly soil pH by an average of 0.06 units.

Discussion

Variations of rhizodeposited C along the leaf economics spectrum

The aim of this study was to elucidate the impact of two fertility levels on rhizodeposited C from grassland species characterized by different nutrient acquisition strategies. We found that total rhizodeposited C differed significantly across the four species studied but that the *a priori* leaf / plant economics spectrum did not allow to identified a clear pattern of rhizodeposition in function of plant nutrient acquisition strategy. Plant functional traits showed few links with rhizodeposition patterns since only root nitrogen content was correlated with specific rhizodeposited C. However, total root biomass was largely related to total and specific rhizodeposited C. The relationship between root biomass and rhizodeposition was expected from other studies on grassland species (Van der Krift *et al.*, 2001; Pausch *et al.*, 2013) or forest species (Haynes & Gower, 1995; Bowden *et al.*, 2004). Nevertheless, this is the first time that the quantity of rhizodeposits produced per g of root is negatively correlated with total root biomass, with plants with the amount of rhizodeposited C thus decreasing proportionally to the square of total root biomass. Detailed mechanisms underpinning this result are difficult to identify, and in particular whether the plant-soil C fluxes are a passive or active process (Wright *et al.* 1998; Warembourg & Estelrich 2001; Bahn *et al.*, 2013). In the case of passive mechanism, rhizodeposition could depend on the strength of the C sink in microbial communities (Wright *et al.* 1998; Bahn *et al.*, 2013), even if this suggestion was not supported by our results since no change was found in soil microbial biomass. Another passive mechanism could be linked to the fact that exploitative species could have lower C-use efficiency (defined as a high growth rate but at high respiratory cost) with a high loss of C per respiration leading to a greater C lost in the rhizosphere stimulating microbial communities (Warembourg & Esterich, 2001). Active processes could be linked to root morphology since exploitative species are characterized by higher specific root length than conservative species (Eissenstat , 2000). Thus, exploitative species produce thinner and longer root systems allowing a stronger rhizodeposition by the increase of root exchange surface (Jones *et al.* 2004), which could explain that these species showed lower rhizodeposition per gram of roots.

The correlation between root nitrogen content and total C rhizodeposition could just reflect a dilution effect of nitrogen in roots since root nitrogen concentration was negatively correlated with root biomass and thus with total rhizodeposition of C.

Effects of fertilisation on rhizodeposited C

Although specific patterns vary between species, fertilisation impacted total rhizodeposited C but not specific rhizodeposited C. However in both cases, the effect of fertilisation could be explained by changes in root biomass for each species as suggested by strong interactive effects of species and fertilisation, since only two species showed an increase of root biomass with fertilisation. This impact of N fertiliser on the amount of rhizodeposition has already been reported in the literature (Bertin *et al.*, 2003; Nguyen, 2003) and linked to changes in root morphology such as specific root length (which traits?) (Hodge *et al.*, 1996; Paterson & Sim, 1999). It would support the hypothesis of an active process of rhizodeposition modulated by root plasticity and the identity of plant species, throughout an increase of root biomass or finer root system (Van der Krift *et al.*, 2001 ; Jones *et al.*, 2004). In fact, the increase in total C rhizodeposited by *D. glomerata* and *A. odoratum* in response to fertilisation was linked to an increase in root biomass (Van der Krift *et al.*, 2001), and conversely neither root biomass nor the amount of rhizodeposited C responded to fertilization in *B. media*. However, in *L. perenne*, the decrease in rhizodeposition under fertilization was not associated with a decrease in root biomass, and may be explained by a decrease in SRL as previously reported for this species (Paterson & Sim, 1999). Other mechanisms usually reported as influencing rhizodeposition such as strength of the C sink of microbial communities (Kaschuk *et al.*, 2009 ; Bahn *et al.*, 2013) or leaf biomass (Dijkstra *et al.*, 2006) were not supported by our results. In fact, whatever the amount of C rhizodeposited by each species with or without fertilisation, no change was observed in soil microbial biomass even if more ^{13}C was accumulated in this microbial biomass under higher rhizodeposition. As we did not explained an increase of C rhizodeposited by an increase of microbial C requirement, our results suggest that C allocation to the rhizosphere is driven by the plant, and is contrary to numerous previous studies (Kaschuk *et al.*, 2009; Lendenmann *et al.*, 2011; Bahn *et al.*, 2013). The known fact that the intensity of rhizodeposition would be controlled by the rate of photosynthesis (Kuzyakov & Cheng, 2004) and also indirectly by leaf biomass (Craine *et al.*, 1999) was not supported by our results. In fact, whatever the treatment or species considered, leaf biomass did not systematically increased together with rhizodeposited C. As our result confirmed that rhizodeposition was preferentially influenced by root trait when compared to leaf characteristics.

Conclusion

The method developed for this experiment enabled homogenous ^{13}C -labelling and the

separation of plant-derived $\text{CO}_2\text{-C}$ from microbial-derived $\text{CO}_2\text{-C}$. It provides a useful approach to assess mechanisms involved in different patterns of plant rhizodeposition under different fertility levels. The results of this study suggest that changes in the amount of C rhizodeposited under different levels of nutrient availability were driven mainly by root morphology rather than by leaf characteristics or soil microbes. Patterns of C rhizodeposition depended on species identity but not on their leaf economics strategies for the 4 species studied. However, these results were obtained in controlled conditions and require further studies with more species to validate finding and used method.

Bibliography

- Aranjuelo, I., G. Erice, S. Nogues, F. Morales, J. J. Irigoyen, and M. Sanchez-Diaz. 2008. The mechanism(s) involved in the photoprotection of PSII at elevated CO₂ in nodulated alfalfa plants. *Environmental And Experimental Botany* **64**:295-306.
- Bahn, M., F. A. Lattanzi, R. Hasibeder, B. Wild, M. Koranda, V. Danese, N. Bruggemann, M. Schmitt, R. Siegwolf, and A. Richter. 2013. Responses of belowground carbon allocation dynamics to extended shading in mountain grassland. *New Phytologist* **198**:116-126.
- Bertin, C., X. H. Yang, and L. A. Weston. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant And Soil* **256**:67-83.
- Bowden, R. D., E. Davidson, K. Savage, C. Arabia, and P. Steudler. 2004. Chronic nitrogen additions reduce total soil respiration and microbial respiration in temperate forest soils at the Harvard Forest. *Forest Ecology and Management* **196**:43-56.
- Cossani, C. M., R. Savin, and G. A. Slafer. 2007. Contrasting performance of barley and wheat in a wide range of conditions in Mediterranean Catalonia (Spain). *Annals of Applied Biology* **151**:167-173.
- Craine, J. M., D. A. Wedin, and F. S. Chapin. 1999. Predominance of ecophysiological controls on soil CO₂ flux in a Minnesota grassland. *Plant And Soil* **207**:77-86.
- Dakora, F. D. and D. A. Phillips. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant And Soil* **245**:35-47.
- Denef, K., D. Roobroeck, M. Wadu, P. Lootens, and P. Boeckx. 2009. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* **41**:144-153.
- Dijkstra, F. A., S. E. Hobbie, and P. B. Reich. 2006. Soil processes affected by sixteen grassland species grown under different environmental conditions. *Soil Science Society Of America Journal* **70**:770-777.
- Dilkes, N. B., D. L. Jones, and J. Farrar. 2004. Temporal dynamics of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. *Plant Physiology* **134**:706-715.
- Eissenstat, D. 2000. Root structure and function in an ecological context. *New Phytologist* **148**:353-354.
- Haynes, B. E. and S. T. Gower. 1995. BELOWGROUND CARBON ALLOCATION IN UNFERTILISED AND FERTILISED RED PINE PLANTATIONS IN NORTHERN WISCONSIN. *Tree Physiology* **15**:317-325.
- Hodge, A., S. J. Grayston, and B. G. Ord. 1996. A novel method for characterisation and

- quantification of plant root exudates. *Plant And Soil* **184**:97-104.
- Johansson, G. 1992. RELEASE OF ORGANIC-C FROM GROWING ROOTS OF MEADOW FESCUE (*FESTUCA-PRATENSIS* L). *Soil Biology & Biochemistry* **24**:427-433.
- Jones, D. L., A. Hodge, and Y. Kuzyakov. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* **163**:459-480.
- Kaschuk, G., T. W. Kuyper, P. A. Leffelaar, M. Hungria, and K. E. Giller. 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology & Biochemistry* **41**:1233-1244.
- Kuzyakov, Y. and W. Cheng. 2004. Photosynthesis controls of CO₂ efflux from maize rhizosphere. *Plant And Soil* **263**:85-99.
- Kuzyakov, Y., J. K. Friedel, and K. Stahr. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology & Biochemistry* **32**:1485-1498.
- Kuzyakov, Y. and X. Xu. 2013. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist* **198**:656-669.
- Lendenmann, M., C. Thonar, R. L. Barnard, Y. Salmon, R. A. Werner, E. Frossard, and J. Jansa. 2011. Symbiont identity matters: carbon and phosphorus fluxes between *Medicago truncatula* and different arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **21**:689-702.
- Lesuffleur, F. and J. B. Cliquet. 2010. Characterisation of root amino acid exudation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant And Soil* **333**:191-201.
- Lynch, J. M. and J. M. Whipps. 1990. SUBSTRATE FLOW IN THE RHIZOSPHERE. *Plant And Soil* **129**:1-10.
- Meharg, A. A. 1994. A CRITICAL-REVIEW OF LABELING TECHNIQUES USED TO QUANTIFY RHIZOSPHERE CARBON-FLOW. *Plant And Soil* **166**:55-62.
- Merbach, W., E. Mirus, G. Knof, R. Remus, S. Ruppel, R. Russow, A. Gransee, and J. Schulze. 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **162**:373-383.
- Molina, J. A. E. and P. Smith. 1998. Modeling carbon and nitrogen processes in soils. Pages 253-298 in D. L. Sparks, editor. *Advances in Agronomy*, Vol 62.
- Nguyen, C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* **23**:375-396.
- Nicol, R. W., L. Yousef, J. A. Traquair, and M. A. Bernards. 2003. Ginsenosides stimulate the

- growth of soilborne pathogens of American ginseng. *Phytochemistry* **64**:257-264.
- Passioura, J. B. 2002. Environmental biology and crop improvement. *Functional Plant Biology* **29**:537-546.
- Paterson, E. 2003. Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. *European Journal of Soil Science* **54**:741-750.
- Paterson, E. and A. Sim. 1999. Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. *Plant And Soil* **216**:155-164.
- Paterson, E. and A. Sim. 2000. Effect of nitrogen supply and defoliation on loss of organic compounds from roots of *Festuca rubra*. *Journal Of Experimental Botany* **51**:1449-1457.
- Pausch, J., J. Tian, M. Riederer, and Y. Kuzyakov. 2013. Estimation of rhizodeposition at field scale: upscaling of a C-14 labeling study. *Plant And Soil* **364**:273-285.
- Rovira, A. D. 1969. PLANT ROOT EXUDATES. *Botanical Review* **35**:35-&.
- Schmidt, S. K., E. K. Costello, D. R. Nemergut, C. C. Cleveland, S. C. Reed, M. N. Weintraub, A. F. Meyer, and A. M. Martin. 2007. Biogeochemical consequences of rapid microbial turnover and seasonal succession in soil. *Ecology* **88**:1379-1385.
- Vale, M., C. Nguyen, E. Dambrine, and J. L. Dupouey. 2005. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. *Soil Biology & Biochemistry* **37**:2329-2333.
- Van der Krift, T. A. J., P. J. Kuikman, F. Moller, and F. Berendse. 2001. Plant species and nutritional-mediated control over rhizodeposition and root decomposition. *Plant And Soil* **228**:191-200.
- Warembourg, F. R. and H. D. Estelrich. 2001. Plant phenology and soil fertility effects on below-ground carbon allocation for an annual (*Bromus madritensis*) and a perennial (*Bromus erectus*) grass species. *Soil Biology & Biochemistry* **33**:1291-1303.
- Wright, D. P., D. J. Read, and J. D. Scholes. 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* **21**:881-891.

Table 2. Effects of species, fertilisation and time on plant functional traits and properties. Values are results of ANOVAs (F).

Variable	Effect	F (dl)	P
Total biomass	<i>Species</i>	37.47 (3,47)	<0.0001
	<i>Time</i>	2.00 (1,47)	0.16
	<i>Fertility</i>	16.16 (1,47)	0.0002
	<i>Species × Time</i>	1.64 (3,47)	0.19
	<i>Species × Fertility</i>	5.88 (3,47)	0.001
	<i>Time × Fertility</i>	0.10 (1,47)	0.77
	<i>Species × Time × Fertility</i>	0.13 (3,47)	0.93
Leaf biomass	<i>Species</i>	34.15 (3,47)	<0.0001
	<i>Time</i>	1.01 (1,47)	0.32
	<i>Fertility</i>	17.38 (1,47)	<0.0001
	<i>Species × Time</i>	0.97 (3,47)	0.41
	<i>Species × Fertility</i>	6.28 (3,47)	0.001
	<i>Time × Fertility</i>	0.002 (1,47)	0.96
	<i>Species × Time × Fertility</i>	0.54 (3,47)	0.66
Root biomass	<i>Species</i>	32.82 (3,47)	<0.0001
	<i>Time</i>	2.60 (1,47)	0.11
	<i>Fertility</i>	7.04 (1,47)	0.01
	<i>Species × Time</i>	2.16 (3,47)	0.10
	<i>Species × Fertility</i>	9.77 (3,47)	<0.0001
	<i>Time × Fertility</i>	0.20 (1,47)	0.65
	<i>Species × Time × Fertility</i>	0.06 (3,47)	0.97
Leaf N content	<i>Species</i>	3.32 (3,44)	0.03
	<i>Time</i>	0.56 (1,44)	0.45
	<i>Fertility</i>	1.96 (1,44)	0.16
	<i>Species × Time</i>	0.18 (3,44)	0.90
	<i>Species × Fertility</i>	2.66 (3,44)	0.06
	<i>Time × Fertility</i>	0.12 (1,59)	0.73
	<i>Species × Time × Fertility</i>	0.05 (3,59)	0.99
Root N content	<i>Species</i>	16.93 (3,59)	<0.0001
	<i>Time</i>	1.07 (1,59)	0.30
	<i>Fertility</i>	3.65 (1,59)	0.06
	<i>Species × Time</i>	2.11 (3,59)	0.11
	<i>Species × Fertility</i>	6.94 (3,59)	0.0006
	<i>Time × Fertility</i>	1.54 (1,59)	0.22
	<i>Species × Time × Fertility</i>	0.74 (3,59)	0.53

Table 5. Effects of species, fertilisation and time on soil properties and microbial biomass. Values are results of ANOVAs (F).

Variable	Effect	F (dl)	P
Soil NH₄⁺	<i>Species</i>	41.4 (3,46)	<0.0001
	<i>Time</i>	22.8 (1,46)	<0.0001
	<i>Fertility</i>	12.7 (1,46)	0.0009
	<i>Species × Time</i>	2.16 (3,46)	0.10
	<i>Species × Fertility</i>	0.96 (3,46)	0.41
	<i>Time × Fertility</i>	1.50 (1,46)	0.23
	<i>Species × Time × Fertility</i>	3.60 (3,46)	0.02
Immobilized NH₄⁺ in microbial biomass	<i>Species</i>	8.37 (3,46)	0.0002
	<i>Time</i>	34.6 (1,46)	<0.0001
	<i>Fertility</i>	15.5 (1,46)	0.0003
	<i>Species × Time</i>	1.44 (3,46)	0.24
	<i>Species × Fertility</i>	1.91 (3,46)	0.14
	<i>Time × Fertility</i>	3.65 (1,46)	0.06
	<i>Species × Time × Fertility</i>	2.92 (3,46)	0.04
C microbial biomass	<i>Species</i>	0.98 (3,45)	0.41
	<i>Time</i>	48.3 (1,45)	<0.0001
	<i>Fertility</i>	0.34 (1,45)	0.56
	<i>Species × Time</i>	1.05 (3,45)	0.38
	<i>Species × Fertility</i>	0.98 (3,45)	0.41
	<i>Time × Fertility</i>	5.73 (1,45)	0.02
	<i>Species × Time × Fertility</i>	0.69 (3,45)	0.56
pH	<i>Species</i>	11.8 (3,47)	<0.0001
	<i>Time</i>	0.03 (1,47)	0.86
	<i>Fertility</i>	14.9 (1,47)	0.0004
	<i>Species × Time</i>	0.07 (3,47)	0.97
	<i>Species × Fertility</i>	0.24 (3,47)	0.86
	<i>Time × Fertility</i>	1.03 (1,47)	0.31
	<i>Species × Time × Fertility</i>	0.16 (3,47)	0.92

Figure 1. (a) Total and (b) specific rhizodeposited C in soil under each species and fertilisation treatments. Legends : *Dactylis glomerata* (DG), *Lolium perenne* (LP), *Anthoxanthum odoratum* (AO), *Briza media* (BM), nutrient solution without (-N) or with nitrogen addition (+N).

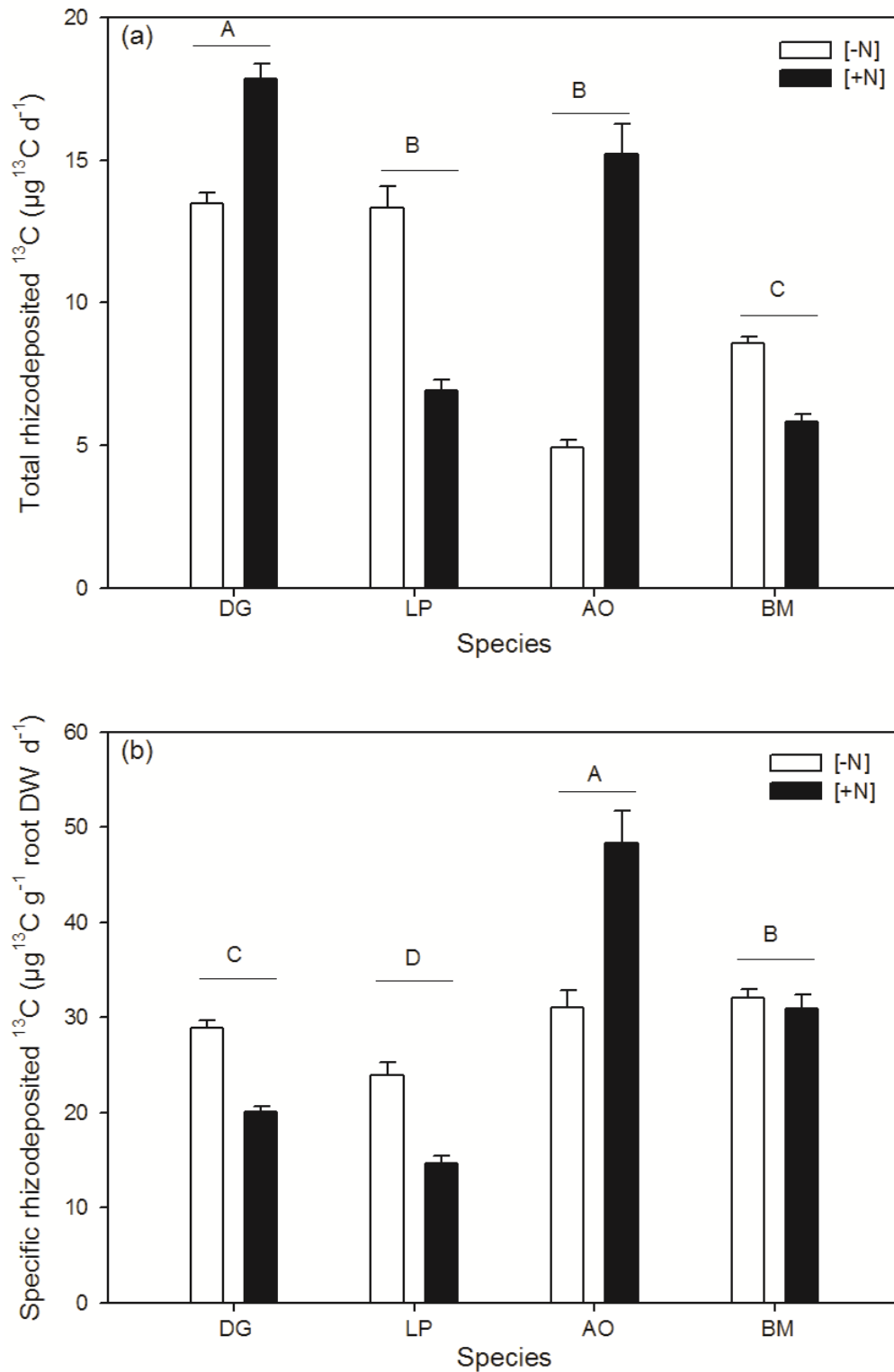
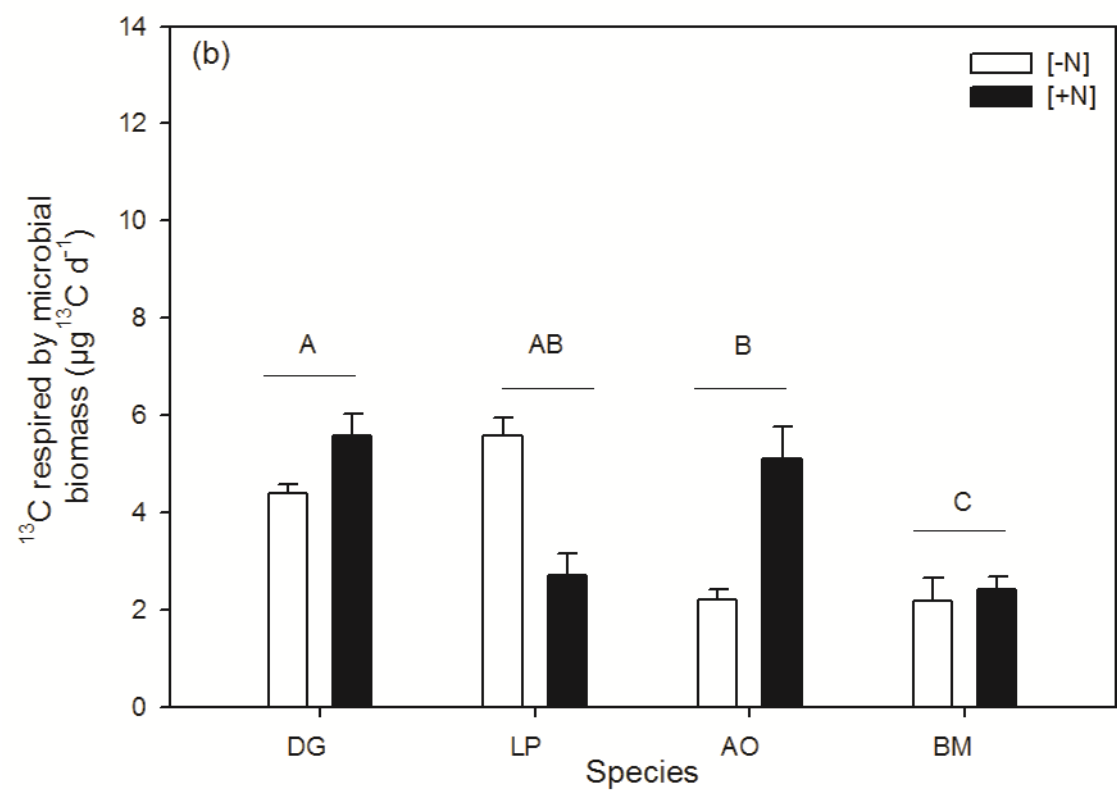
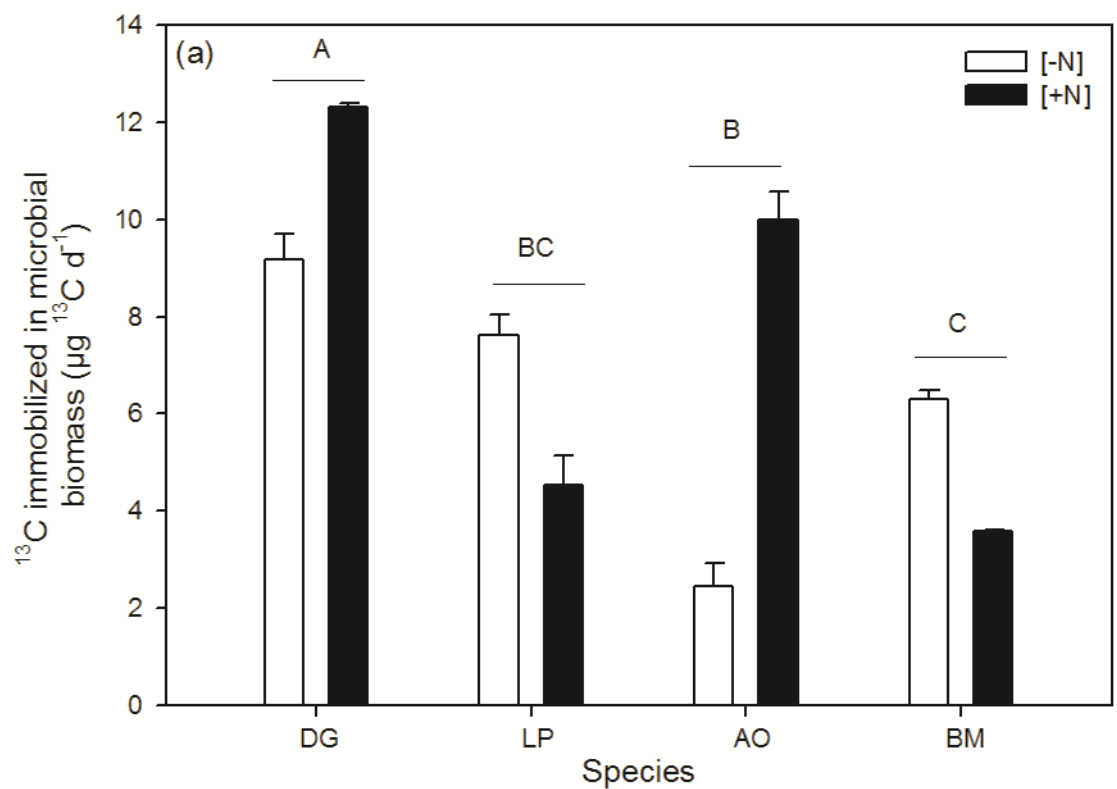
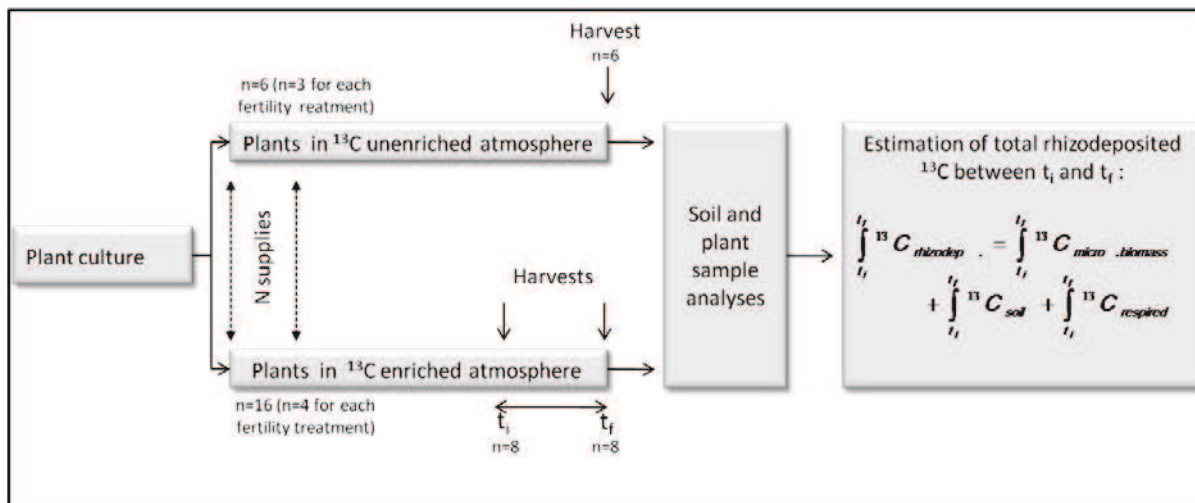
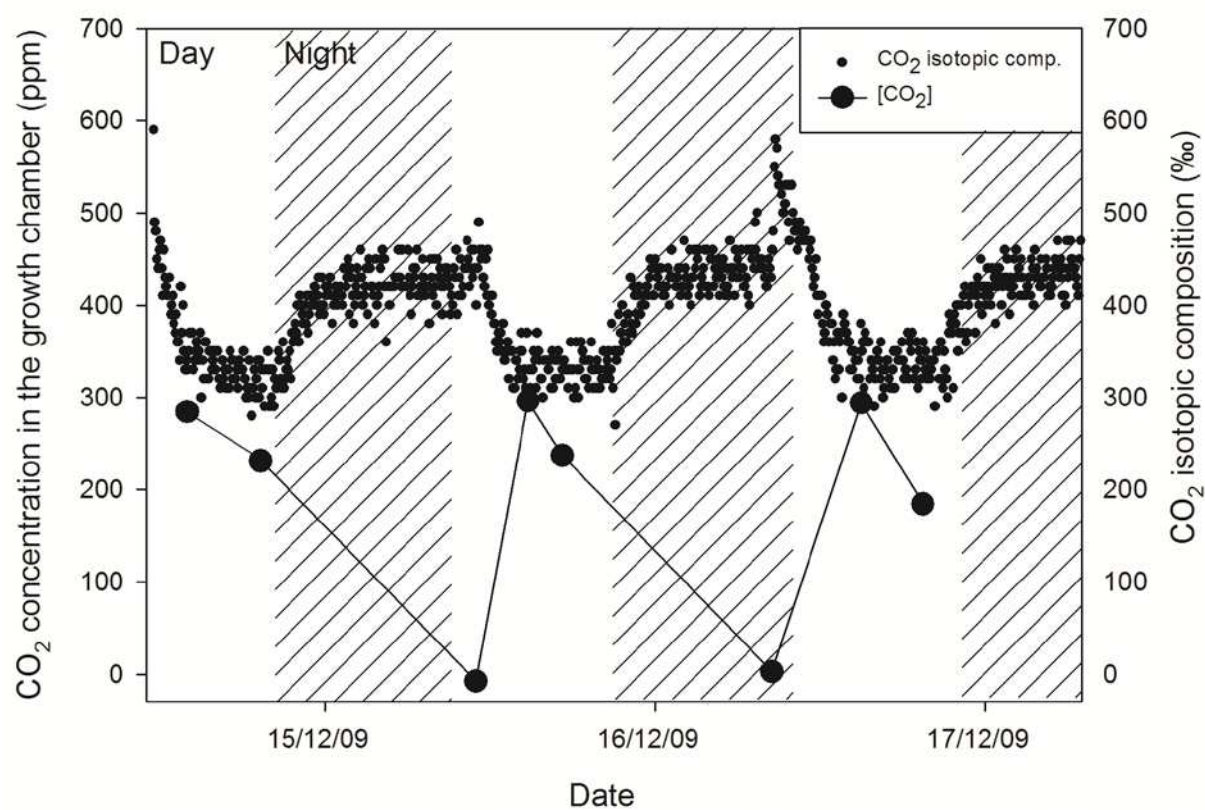


Figure 2. Rhizodeposited C (a) accumulated and (b) respired by soil microbial biomass in soil under each species and fertilisation treatments. Legends : *Dactylis glomerata* (DG), *Lolium perenne* (LP), *Anthoxanthum odoratum* (AO), *Briza media* (BM), nutrient solution without (-N) or with nitrogen addition (+N).



Appendix 1. Schematic representation of the experimental design to estimate C rhizodeposition.

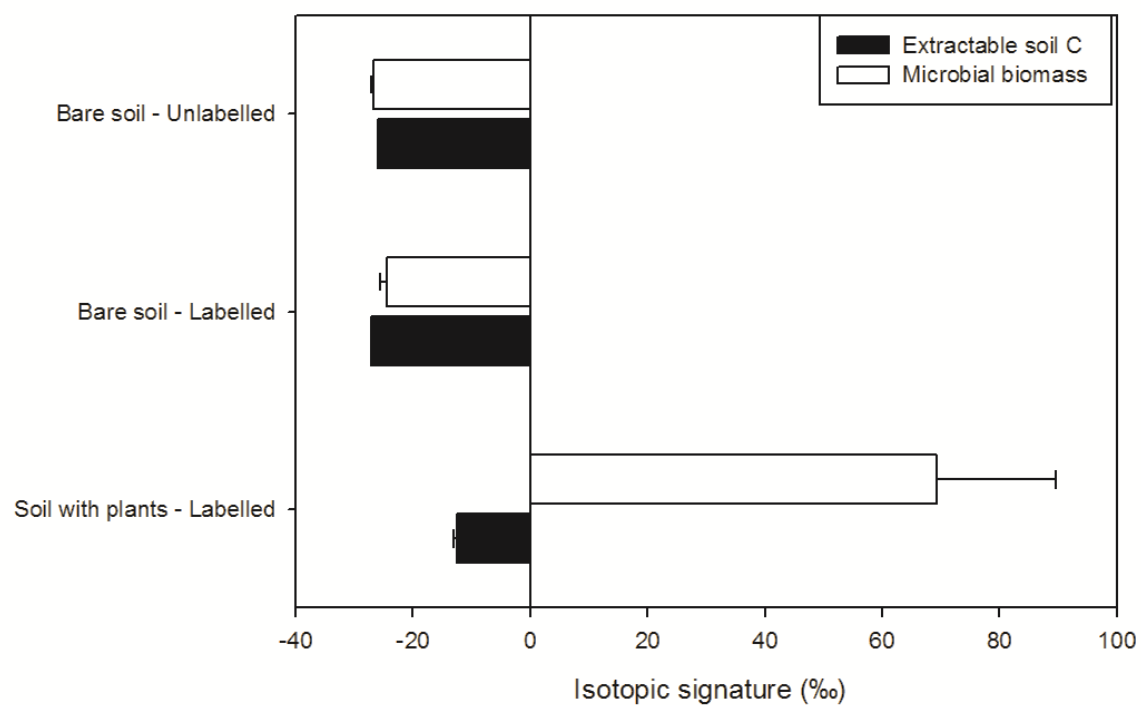


Appendix 2. Isotopic composition of atmospheric CO₂ in the growth chamber.

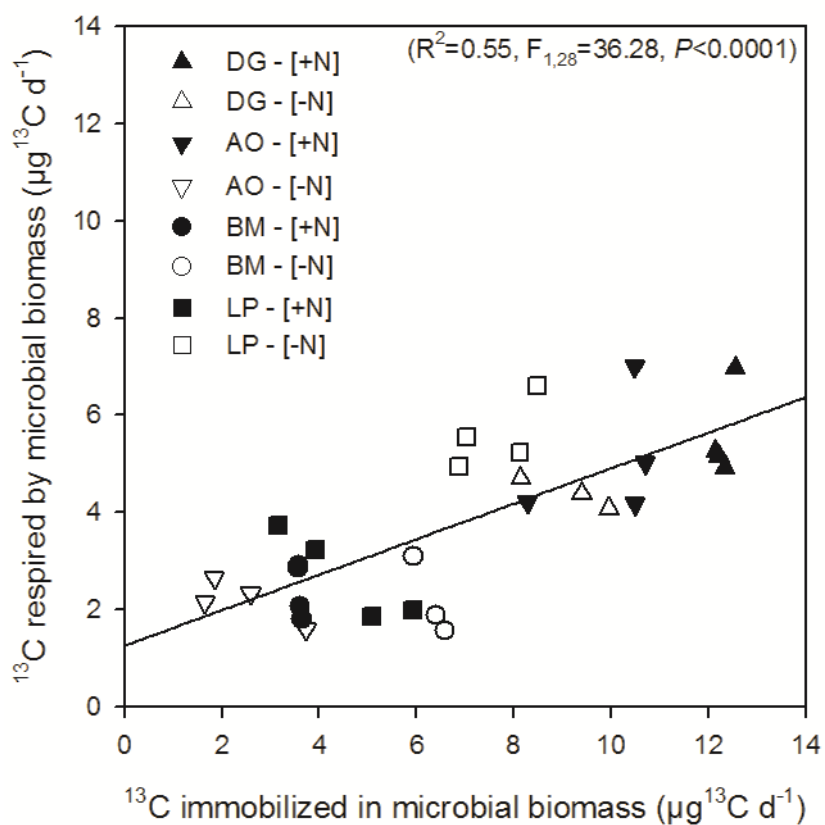
Appendix 3. Effects of species, fertilisation and time on leaf and root isotopic composition. Values are results of ANOVAs (F).

Variable	Effect	F (dl)	P
Leaf isotopic composition	<i>Species</i>	1.61 (3,59)	0.19
	<i>Time</i>	22.6 (1,59)	<0.0001
	<i>Fertility</i>	1.07 (1,59)	0.30
	<i>Species × Time</i>	2.02 (3,59)	0.12
	<i>Species × Fertility</i>	0.68 (3,59)	0.56
	<i>Time × Fertility</i>	1.45 (1,59)	0.23
	<i>Species × Time × Fertility</i>	1.21 (3,59)	0.31
Root isotopic composition	<i>Species</i>	4.83 (3,60)	0.0053
	<i>Time</i>	2.39 (1,60)	0.13
	<i>Fertility</i>	0.32 (1,60)	0.57
	<i>Species × Time</i>	0.64 (3,60)	0.59
	<i>Species × Fertility</i>	1.48 (3,60)	0.23
	<i>Time × Fertility</i>	0.56 (1,60)	0.45
	<i>Species × Time × Fertility</i>	1.48 (3,60)	0.23

Appendix 4. Isotopic composition of extractable soil C and microbial biomass in “bare soil” and soil under plants.



Appendix 5. Correlation between ^{13}C respired by microorganisms and ^{13}C accumulated in microbial biomass. Legend : *Dactylis glomerata* (DG), *Lolium perenne* (LP), *Anthoxantum odoratum* (AO), *Briza media* (BM), nutrient solution without (-N) or with nitrogen addition (+N).



Chapitre 4

Contribution des traits fonctionnels végétaux aux processus d'un écosystème simplifié

Dans le chapitre 3, nous avons identifié les traits fonctionnels végétaux impliqués dans les relations avec les propriétés microbiennes du sol. Cette étude nous amène à suspecter que les traits fonctionnels racinaires soient étroitement liés à la réponse des plantes à une limitation en nutriments, ce qui influence les microorganismes du sol. L'expérimentation présentée en annexe a en partie confirmé notre hypothèse sur le rôle des racines puisqu'elle a révélé que les patrons d'exsudation des différentes espèces étaient fortement liés à la biomasse et au contenu en N des racines. Cependant, ces deux études en conditions contrôlées ont été menées sur des périodes assez courtes (2 à 3 mois), sur des individus cultivés seuls et réimplantés (procédé stressant pour les plantes), pouvant biaiser les réponses des plantes vis-à-vis de la disponibilité des nutriments et des microorganismes du sol. Ces conditions sont donc très éloignées de conditions naturelles où de nombreux individus de différentes espèces végétales sont en interactions, compliquant les interactions plantes-microorganismes.

Dans ce chapitre, je présente les résultats d'une expérimentation qui a consisté à mettre en place des communautés artificielles dans des mésocosmes installés *in situ* sur les trois sites européens du projet VITAL. Ce dispositif a été utilisé pour manipuler la proportion de quatre espèces différant par leurs stratégies d'acquisition et d'utilisation des nutriments afin d'obtenir un gradient de traits fonctionnels végétaux dans les communautés réalisées. L'application d'un traitement de fertilisation a permis d'une part d'augmenter la gamme de traits fonctionnels, et d'autre part de déterminer l'influence des effets conjoints des propriétés du sol (disponibilité des nutriments et humidité) et des traits végétaux sur les interactions plantes-microorganismes. Enfin, les mésocosmes sont des écosystèmes simplifiés, et ces différents traitements nous ont également permis de mesurer une gamme de propriétés écosystémiques tels que la production de biomasse et la capacité de rétention des nutriments du sol.

Cette étude avait pour objectif de déterminer les effets relatifs des traits fonctionnels végétaux, des paramètres fonctionnels microbiens et des propriétés du sol, ainsi que ceux de leurs interactions sur différentes propriétés de l'écosystème, qui reflètent en partie son fonctionnement en relation avec le recyclage de l'N. Les résultats obtenus et les conclusions que nous avons tirés de ces travaux seront présentés sous forme d'un article encore actuellement en préparation.

Article 2

Plant – soil – microorganism interactions associated with bundles of ecosystem services in mountain grasslands

Legay N, Lavorel S, Baxendale C, Krainer U, Cantarel A, Kastl E, Colace M.-P, Bahn M, Grigulis K, Poly F, Pommier T, Schlöter M, Clément J.-C and R.D. Bardgett

In preparation for Journal of Ecology

Abstract

1. Soil abiotic properties are major drivers of plant functional traits and soil microbial community composition. As a result, the interactions between all of these variables are likely to influence many ecosystem processes such as plant biomass production or nutrient leaching and retention, but the contribution of each of these groups of drivers to ecosystem functioning are poorly known.
2. This study aimed to quantify the relative contribution of soil, plant and microbial properties to variations in a range of ecosystem properties (EP), and to identify their specific driving parameters. Artificial herbaceous plant communities were implanted at three sites across Europe in mesocosms with original soil from each site, with a constant species richness of four species, but with varying evenness in mixtures of one exploitative and one conservative grass species, and one exploitative and one conservative dicot species, to produce a gradient of community-level trait variation.
3. Simultaneous variations in multiple EPs associated with N cycling were driven by combined effects of plant traits, microbial parameters and soil properties, and the contribution of each of these drivers varied depending on original inorganic N availability in each site's soil. Within each group of drivers, root functional traits, microbial denitrification parameters and soil nutrient and water availability were variables which most explained patterns of co-variation among EPs.
4. The response of plant biomass production to soil abiotic properties, plant functional diversity and microbial functional parameters was independent of the response of soil ecosystem processes. Among soil processes on the other hand, there was a trade-off between nutrient retention and nutrient loss whereas plant biomass production. Above-ground biomass production was associated with high soil nutrient availability, large root diameter and vegetative height, and low NEA and DEA. Soil processes leading to high nutrient losses were characterised by high nutrient availability, exploitative plant traits (high vegetative height, root diameter and root N concentrations) and microbial parameters favouring high recycling of N (DEA and NEA). Conversely, conservative plant traits (high RDMC) and low microbial activities were mainly related to high soil nutrient retention.
5. *Synthesis* - Ecosystem services in herbaceous artificial communities are the results of combined effects of a set of soil, plant and microbial properties. Together with soil nutrient availability, root functional traits and denitrification parameters could represent key markers of N cycling in grasslands. Further investigations of the detailed mechanisms underpinning their interrelationships, and their effects on N cycling are needed.

Keywords: leaf traits, root traits, denitrifying and nitrifying communities, ecosystem service trade-offs, nitrogen cycling, soil properties, plant-soil-microbe interactions

Introduction

Current research on terrestrial ecosystems has clearly showed that human activities alter their biodiversity, their functioning and the services they provide (Vitousek *et al.*, 1997). Land use change is one of the major factors influencing ecosystem processes such as primary productivity or nutrient cycling, notably through agricultural practices (Zeller *et al.* 2001; Wookey *et al.*, 2009). Agricultural management alters ecosystem functioning by changing soil nutrient availability and by applying disturbances such as mowing and grazing. These perturbations simultaneously influence soil abiotic conditions, the composition of plant communities, and the structure and activities of soil microbial communities (Hamilton & Franck, 2001 ; Bardgett & Wardle, 2003; Robson *et al.* 2007). Most investigations of agricultural impacts on ecosystems, and specifically on grasslands, have focused on the overall effects of these different groups of drivers (soil abiotic conditions, plant community composition and soil microbial communities) on ecosystem properties (Wardle *et al.*, 2004; Van der Putten *et al.*, 2009), but the understanding of how each group of drivers, and the interactions among them contribute to these ecosystem properties remains largely unclear (De Deyn *et al.*, 2009 ; Le Roux *et al.*, 2013).

Soil nutrient and water availabilities are major factors influencing above- and below-ground plant productivity (Hawkins *et al.*, 2003; Hodge *et al.* 2006) and the quality of green above-ground biomass (Seguin *et al.*, 2002; Pontes *et al.*, 2007). These parameters along with soil pH, soil texture, and exchange capacity influence the rates of potentially leached nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) (Di & Cameron, 2002; Qian & Cai, 2007). Numerous studies have also reported the effects of plant and microbial communities on ecosystems processes (Cleveland *et al.* 1999; Diaz *et al.*, 2007; Van der Heijden *et al.*, 2008). Plant functional traits have been shown to be robust predictors of ecosystem functioning (Lavorel & Garnier, 2002; Lavorel, 2013), and an increasing number of studies are supporting their influence on aboveground biomass productivity (Poorter & De Jong, 1999; Garnier *et al.*, 2004, Lavorel *et al.* 2011, Minden & Kleyer, 2011, Laliberté & Tylianakis, 2012) and nutritional quality (Pontes *et al.* 2007; Ansquer *et al.* 2009), root productivity (Craine *et al.* 2002), and N mineralization (Laughlin, 2011). Microbial functional parameters, i.e. composition or enzymatic activities of microbial communities, have also large impacts on ecosystem functioning, and especially on nutrient cycling. The abundance and community structure of nitrifiers, the rate of nitrification activities (Le Roux *et al.*, 2008), as well as the proportion of fungi relative to bacteria in soil (F : B ratio) (Bardgett & McAlister, 1999), have been linked

to soil nutrient availability, and thereby indirectly impact aboveground productivity (Bever *et al.* 1997; Van der Heijden *et al.*, 2008), soil organic matter decomposition or nutrient leaching (Grayston *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 2008). However, most of these studies have considered above-ground and below-ground functional parameters in isolation, even if recent works on ecosystem processes have explored their interactions (Orwin *et al.*, 2010, Grigulis *et al.*, 2013), and have suggested that the complexity of these interactions could have strong consequences for ecosystem functioning.

Above – below-ground linkages play an important role in terrestrial ecosystems as drivers of ecosystem functioning and processes (Wardle *et al.*, 2004; Bardgett *et al.* 2005). Over the last decade, numerous studies have focused on relationships between plant functional traits and microbial functional parameters (De Deyn *et al.*, 2008; Van der Heijden *et al.*, 2008). For instance, it has been shown that plant litter quality, defined by tissue chemical composition (Wardle, 1992; Aerts, 1999), influences the composition of soil microbial communities (Eskelinen *et al.*, 2009), and thus changes the rate of N mineralization in soils (Laughlin, 2011), and soil nutrient availabilities and leaching (Qian & Cai, 2007). Lastly, the amount and quality of root exudates impact microbial community composition and activities (Griffiths *et al.* 1999; Jones *et al.*, 2004), which in turn influence soil organic matter decomposition (Kuzyakov *et al.*, 2006) and nutrient cycling (Denef *et al.*, 2009). Overall, these plant-microbial relationships have been well resumed in the study of Orwin *et al.* (2010) which showed that the ratio of fungi to bacterial abundances (F : B) varied concomitantly with leaf and root traits. These authors have suggested that the relationship with leaf traits (N concentration) reflected leaf litter quality effects while root traits (N and C concentrations) may co-vary with the amount and quality of root exudates. Although these studies have increased our knowledge on mechanisms involved in above - below-ground feedbacks and their impacts on ecosystem functioning, none has quantified the relative contribution of soil, plant and microbial properties to the variation of different ecosystem properties associated with C and N cycling, which underpin a variety of ecosystem services (Barrios, 2007; Dominati *et al.*, 2010). To our knowledge, only the study of Grigulis *et al.*, (2013) has quantified the relative contributions of plant functional traits and microbial functional parameters related to N cycling to a range of above- and below-ground ecosystem processes measured under field conditions. Nevertheless, soil abiotic properties, which are major drivers of ecosystem processes related to nitrogen (N) and carbon (C) cycling through their effects on plants (Grime, 1977; Tilman, 1985) and microbial communities (Patra *et al.*, 2006; Bremer *et al.*, 2007; Le Roux *et al.*, 2008), were not included in this study which focused specifically on

plant – microbial trait interactions. In addition, this field study did not incorporate root functional traits, though they might significantly participate to many ecosystem processes (Craine *et al.*, 2002; Klumpp *et al.*, 2009a; Orwin *et al.*, 2010).

The aim of the present study was to investigate the relative contributions of plant functional traits (above- and below-ground), microbial functional parameters related to N cycling, and soil abiotic properties to variation of a set of C and N cycling ecosystem processes underpinning major ecosystem services provided by grasslands. We used artificial herbaceous plant communities at three sites across Europe with distinct climates and soils, assembled to produce a gradient of plant functional trait variation independent of species richness, and submitted to a fertilisation treatment. Here, we evaluated the relative effects of plant traits, microbial parameters, soil properties, and their interactions, on above- and below-ground biomass, microbial biomass N, potential nitrogen mineralization, soil organic matter content and potential leaching of soil nitrate. We hypothesized that: (i) across the three sites, the relative contributions of plant, microbial and soil parameters to the variance in ecosystem properties will vary from dominant microbial contribution to dominant plant contribution along the realised gradient from conservative to exploitative plant communities, (ii) original soil fertility and fertilisation impact bundles and trade-offs among ecosystem properties, and modulate the relative roles of plant, microbial and soil parameters at individual sites, (iii) common plant, microbial and soil parameters can be identified across sites as markers of ecosystem services.

Materials and methods

Study sites and plant species

A common experimental design was used at three sites across Europe: the Lautaret Pass (French Alps), the Stubai Valley (Austrian Alps), and Colt Park (United Kingdom) to provide a range of climatic conditions typical of western European temperate mountains. The design focused on producing artificial plant communities with a constant species richness of four species (so as to avoid any potential richness effects on ecosystem functioning), but where variations in evenness were used to produce a gradient of community-level trait variation. Plant communities were implanted in mesocosms using locally abundant species of managed grasslands at each site, including two forbs and two grasses, within which one was selected to represent a more exploitative strategy (higher Specific Leaf Area and Leaf Nitrogen Concentration, lower Leaf Dry Matter Content), and one a more conservative strategy (opposite traits). The two exploitative species, *Dactylis glomerata* (L.) and *Geranium sylvaticum* (L.), were common across the three sites, as was the more conservative forb, *Achillea millefolium* (L.). In contrast, the conservative grass species was specific to each site and chosen to be representative of the most extensively managed grasslands locally, with *Nardus stricta* (L.), *Festuca paniculata* (L.), and *Anthoxanthum odoratum* (L.) for the Austrian, French and English sites respectively, and in order of increasing SLA or LNC, and decreasing LDMC. The soil used in mesocosms was excavated from the most extensively managed grasslands at each site, and allowed to have the lowest level of fertility where selected plant species were present. Soil nutrient availabilities increased from low inorganic N availability ($11.7 \mu\text{gN. g}^{-1}$ dry soil) at the abandoned Austrian site, to intermediate inorganic N availability ($14.5 \mu\text{gN. g}^{-1}$ dry soil) at the lightly grazed French site, and to higher inorganic N availability ($23.9 \mu\text{gN. g}^{-1}$ dry soil) at the English site with long-term low fertilisation inputs (Legay *et al.*, submitted). More details concerning climate, soil and management conditions at each site are given in Grigulis *et al.* (2013).

Experimental design

We conducted a mesocosm experiment for two growing seasons, where plant community composition and fertilisation were manipulated. At the French and English sites, eight planting schemes differing by the relative abundances of the 4 plant species across 36 individual plants were combined with two levels of fertility and replicated four times in a randomized block design (Table 1a). At the Austrian site, only five planting schemes for a total

of 40 mesocosms were established (Table 1b). Except for one planting scheme at the Austrian site, where species were implanted in even proportions (4 sp. x 9 individuals), all planting schemes were representative of field proportions of grasses and forbs, that is 60-80% for grasses and 20-40% for forbs. Ultimately, the different designs were aimed to produce a continuous gradient from plant communities dominated by conservative species to communities dominated by exploitative species.

Table 1. Planting scheme with the respective abundance of each plant functional species in mesocosms at a) the French and English sites, and b) at the Austrian site. *Festuca paniculata* and *Anthoxanthum odoratum* are conservative grass at French and English site respectively.

	<i>Conservative Grass</i>	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Geranium sylvaticum</i>
a) Number of	4	20	3	9
species in each	6	24	2	4
treatment at	10	14	3	9
France and UK	12	18	2	4
site	14	10	9	3
	18	12	4	2
	20	4	9	3
	24	6	4	2
	<i>Nardus stricta</i>	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Geranium sylvaticum</i>
b) Number of	6	24	4	2
species in each	9	9	9	9
treatment at	12	18	4	2
Austrian site	18	12	2	4
	24	6	2	4

Plants were field-collected during summer 2009 in grasslands near each experimental site. Mother plants were separated into 3cm-long pieces of rhizome for *Achillea millefolium*, 1 rosette with 2 leaves for *Geranium sylvaticum*, or 1-2 tillers for the two grasses, then planted in a loam-sand mixture and nursed in garden conditions during 4-6 weeks until planting. Plants were then established in the mesocosms, which were 40-cm deep and 45-cm diameter, filled at the bottom with 5-cm quartz gravels (6-10-mm diameter) and topped with 30-cm of homogenized mineral soil.

Half of the mesocosms were fertilised in spring 2010 and 2011 by adding a total of 100 kg N ha⁻¹ equivalent per year in the form of a urea-based slow release N:P:K fertiliser (20:10:10), applied immediately after the initiation of growth. This fertilisation treatment aimed to

simulate the higher level of fertility in grasslands at each site. All mesocosms were cut to 5-cm above-ground in summer 2010 at a date tailored to each site depending on usual harvest by farmers (e.g. mid/late July at Colt Park, late July at Stubai and early August at Lautaret) to simulate hay cutting.

Harvest and plant trait measurements

At the maximum growing rate of vegetation at the end of June, early July and end of July 2011 for the English, French and Austrian sites respectively, the vegetation of the mesocosms was cut and four soil cores (4.5-cm diameter, 10-cm deep) were sieved through a 5.6-mm mesh to obtain root mass and subsamples for soil and microbial analyses. One extra core (6-cm Ø, 6-cm deep) was sampled to measure soil bulk density and parameters related to soil water availability.

Just before vegetation harvest, plant functional traits were measured. Above-ground plant traits (LNC, LCC, leaf C:N ratio, LDMC and Height) were measured using standardized protocols (Cornelissen *et al.*, 2003). Depending of the number of individuals, 3 to 8 replicate plants were taken for each species per pot. Because surface area of leaves of *A. millefolium* could not be measured with satisfactory precision, SLA was not used in this study. The day of the harvest, aboveground-biomass was sorted to individual species to determine dry weight of each species within the realized communities. Community weighted mean traits (CWM; Garnier *et al.*, 2004) and functional divergence (FD; Mason *et al.*, 2003) were calculated following Casanoves *et al.* (2011). Roots were carefully washed in tepid water to allow separation of roots by floatation, placed into an alcohol solution (ethanol 10%, acetic acid 5% v:v), and stored at 4°C until root morphology measurements. Root length and diameter were measured by suspension in 1-cm of demineralized water in a clear acrylic tray and scanned at 300 dpi using a flatbed scanner. Digital root images were processed using the WINRHIZO software (Regent Instruments Inc., Canada). Then, roots were weighed, dried at 70°C, and reweighed to calculate RDMC and SRL. Finally, dry roots were ground to a fine powder (5-µm diameter) for analysis of N and C concentrations using FlashEA 1112 elemental analyser (Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Because these root trait measurements were obtained from community level soil cores, they were considered as community weighted means.

Soil analyses

Fresh sieved (i.e. 5.6-mm mesh) soil subsamples were weighed and stored at -20°C (for further quantification of gene abundance), or 4°C and immediately (within 48h) processed for microbial communities and activities analysis, and for soil chemical analysis. Soil water content (SWC) was determined on fresh soil dried at 70°C for one week. Soil subsamples were air dried and ground to measure total soil C and N with the above-mentioned elemental analyser, and soil pH was measured using a 1:4 (soil: distilled water) solution. Bulk density and soil porosity were obtained measuring the dry mass of a fixed volume (205-cm³) soil core. Prior to drying, 100-ml of distilled water were added to saturate each soil core and allowed calculating water holding capacity and water filled pore space. *In situ* available soil inorganic N was measured using ion exchange resin bags inserted in the center of each mesocosm (10-15-cm deep at a 45° angle) during 6 weeks prior final harvest. Resin bags were made using nylon bags (10×5 or 5×5-cm) containing 5-g of mixed anion cation exchange resin (Amberlite IRN150, VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France). Captured ammonium and nitrate were released from the resins in KCl 1M and soil nutrients (ammonium (NH₄⁺-N), nitrate (NO₃⁻-N), total dissolved nitrogen (TDN), and dissolved organic nitrogen (DON)) were measured from 0.5 M K₂SO₄ soil extracts (Jones and Willett, 2006), then analyzed on a FS-IV colorimetric chain (OI-Analytical, College Station, TX, USA).

Microbial analyses

Potential rates of nitrification were estimated with the measure of kinetic parameters (V_{max} and K_m) following an adapted protocol from Koper *et al.* (2010) and Dassonville *et al.* (2011). Abundance of nitrifiers (ammonium oxidizing archaea - AOA and ammonium oxidizing bacteria - AOB) as well as nitrite oxidizers (Nitrospira - NIP) and Nitrobacter - NIB) were measured based on the gene copy numbers present in soil of ammonium mono-oxygenase gene *amoA* (*amoA*-AOA *amoA*-AOB) and 16S rRNA of NIP and *nrxA* of NIB respectively. Potential denitrification activity (DEA) was determined according to Attard *et al.* (2011), and abundance of denitrifiers was quantified based on the abundance of the nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*). Fungal and bacterial biomass were measured using phospholipid fatty acid (PLFA) analysis, using the Bligh and Dyer method (1959), adapted by White *et al.* (1979) and described by Bardgett *et al.* (1996). Briefly, this involved the extraction, fractionation and quantification of microbial phospholipids. The fatty acids i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 17:0, i17:0, cy17:0, cis18:1ω7 and cy19:0 were chosen to represent

bacterial fatty acids and 18:2 ω 6 to represent fungal fatty acids (Bardgett and McAlister, 1999). Total PLFA was used as a measure of active microbial biomass. The fungi to bacteria ratio was calculated by dividing the fungal PLFA marker (18:2 ω 6) by summed bacterial PLFAs (Bardgett *et al.*, 1996).

Ecosystem properties

Total lived above- (ABM) and below-ground (RM) biomass, soil organic matter content (SOM), potential leaching of NH_4^+ -N and NO_3^- -N, microbial biomass N and potential nitrogen mineralization (PNM), were selected as ecosystem properties likely driven jointly by soil properties, plant functional traits and microbial functional parameters.

ABM and RM were measured as described above. SOM and PNM were estimated using standardized soil method for long term ecological research (Robertson *et al.* 1999). SOM was measured by loss on ignition. Potential leaching of NH_4^+ -N and NO_3^- -N were calculated from the percolate of the central core leached with a given volume of distilled water (de Vries *et al.*, 2011) and analyzed on a FS-IV colorimetric chain (OI-Analytical, College Station, TX, USA). PNM rates were estimated using anaerobic incubations of fresh soil subsamples (dark, 7 days, 40°C), during which organic N was mineralized and accumulated as NH_4^+ -N (Waring & Bremner, 1964; Wienhold, 2007). Difference between NH_4^+ content before (t1) and after the incubation (t2) gave $\text{PNM} = [(\text{NH}_4^+\text{-N})_{t2} - (\text{NH}_4^+\text{-N})_{t1}] / \text{soil dry weight} / 7 \text{ days}$. Finally soil microbial biomass N was measured using the chloroform-extraction fumigation technique of Vance, Brookes & Jenkinson (1987).

Data analyses

To determine relationships between plant functional traits, microbial functional parameters and soil properties and their relative contribution to ecosystem properties, we applied a multi-step analysis using multivariate linear regression. Models were based on analyses (after step of co-variable suppression) of all variables to find relationships between these three components and their relative contributions to ecosystem properties. In the first step, we identified among all plant and microbial traits, as well as soil parameters, those involved in variation of ecosystem properties. To do this, we ran a forward selection with the R package packfor (Dray *et al.*, 2007) using Redundancy Analyses (RDA) with plant, microbial and soil variables as explanatory variables and ecosystem properties as response variables ($P < 0.05$ after 9999 random permutation). We applied the double-procedure proposed by Blanchet *et al.* (2008) to limit the problems of classical forward selections.

Inflated Type I error was avoided by forward selecting only models for which a global test where all explanatory variables was significant. The overestimation of the amount of variance explained was avoided by introducing an additional stopping criterion in that the adjusted coefficient of multiple determination (R^2 adj) of the model could not exceed the R^2 adj obtained when using all explanatory variables. The variables that fulfilled both stopping criteria were identified as the significant environmental variables influencing the ecosystems properties. Variation partitioning (Legendre et al., 2005) was used to evaluate the relative contribution of these groups of variables (plants, microbes and soil) and their interactions to variations in the set of selected ecosystem properties.

The statistical analyses were performed in R version 2.15.1 using the library ‘vegan’ 1.17-3 (Oksanen *et al.* 2008), and the package ‘packfor’ (Dray *et al.*, 2007).

Results

General overview

Over their two seasons of growth, individual plant communities reached species compositions that somewhat deviated from the initial plantings in terms of relative abundances of each of the four species. However, the final compositions still provided a gradient of plant trait community weighted means and functional divergences (Appendix 1, 2 and 3), with for instance CWM LNC ranging from 12.4 to 24.5 mg.g⁻¹ across sites (12.4 – 21.8 mg.g⁻¹ at the Austrian site, 17.6 – 24.5 mg.g⁻¹ at the French site, 13.9 – 16.5 mg.g⁻¹ at the English site) and RNC ranging from 3.8 to 12.1 mg.g⁻¹ across sites (6.0 – 12.1 mg.g⁻¹ at the Austrian site, 3.8 – 10.0 mg.g⁻¹ at the French site, 6.1 – 10.3 mg.g⁻¹ at the English site). The fertilisation treatment did not significantly affect mesocosm CWM LNC except at the UK site. CWM LNC ranged from 12.7 to 28.7 mg.g⁻¹ across sites (12.7 – 20.8 mg.g⁻¹ at the Austrian site, 18.0 – 28.7 mg.g⁻¹ at the French site, 18.1 – 19.9 mg.g⁻¹ at the English site) and RNC varied from 4.0 to 12.0 mg.g⁻¹ across sites (6.8 – 11.5 mg.g⁻¹ at the Austrian site, 5.8 – 12.0 mg.g⁻¹ at the French site, 4.0 – 11.5 mg.g⁻¹ at the English site). Concerning soil parameters (linked to fertility), mesocosm soil inorganic N content ranged from 5.6 to 144.9 µg.g⁻¹ across sites (10.7 – 63.5 µg.g⁻¹ at the Austrian site, 18.7 – 144.9 µg.g⁻¹ at the French site, 5.6 – 127.3 µg.g⁻¹ at the English site), and was significantly influenced by fertilisation (Austria, $t=5.72$ $p<0.001$; France, $t=10.13$ $p<0.001$; England $t=7.82$ $p<0.001$). On the contrary, WFPS mean values ranged from 6.3 to 60.4 % across sites (26.9 – 60.4 % at the Austrian site, 10.7 – 32.0 % at the French site, 6.3 – 9.4 % at the English site), and were affected by fertilisation only at French and English site (Austria, $t=0.47$ $p=0.64$; France, $t=2.73$ $p<0.01$; England $t=13.68$ $p<0.001$).

In the next three sections, we first present the results of each forward multivariate GLM selection used in the analyses to select the most relevant explanatory variables of the set of ecosystem properties (Table 2). The redundancy analysis (RDA) scores and the relative contributions of the three groups of drivers studied (soil properties, plant functional traits and microbial functional parameters) and of their interactions, to variations in ecosystem properties are presented for the pooled data set across sites (Fig 1). Finally, in each site, these same analyses were done for fertilised mesocosms only (Fig 2). RDA were used to determine potential trade-offs and/or bundles between ecosystem properties and their associations with plant trait, microbial functional parameters, and soil abiotic parameters.

All other analyses for the selection of explanatory variables, variance partitioning and RDA scores are not described, but available in Appendix 4, 5 and 6 respectively. They are not discussed in details in this paper but are sometimes cited to generalize or not the results from the analyses presented in more details.

Soil abiotic properties, plant traits and microbial parameters influencing ecosystems properties

Forward selection of multivariate GLMs revealed that variations in ecosystem properties were explained by a common effect of soil abiotic properties, plant functional traits and microbial functional parameters across all sites and fertilised treatments (Table 2 and Appendix 7).

For the data set pooled across sites, and regardless of fertilisation, the percentage of explanation provided by selected variables was always higher than 60% and was highly significant. Explanatory variables linked to soil abiotic properties were related to water availability (WFPS and porosity) for the analysis pooling unfertilised and fertilised mesocosms, and to total soil C in unfertilised and fertilised mesocosms. NIP and DEA were the microbial functional parameters retained in unfertilised and fertilised mesocosms respectively, and were both retained, with the addition of the F:B ratio, when unfertilised and fertilised mesocosms were pooled. The same plant traits were retained in unfertilised and fertilised mesocosms, namely root diameter and C:N ratio; whereas in the model pooling unfertilised and fertilised mesocosms, root diameter, RNC and vegetative height were the most explanatory plant traits (Table 2).

Table 2. Percentages of variation in the set of selected ecosystem properties provided by the relative contribution of each group of variables (soil, plants and microbes), and their interactions. The values correspond to the sum of all R^2_{adj} after variation partitioning. Abbreviations : Total soil carbon (C), soil water filled pore space (WFPS), total soil porosity (Porosity), soil ammonium content (NH_4^+), vegetative height (Height), root dry matter content (RDMC), root C:N ratio (Root C:N), gene abundance of *Nitrospira* (NIP), fungi to bacteria ratio (F:B ratio), gene abundance of *nirS* (NRS), denitrification enzyme activity (DEA).

Site	Treatments	% of explaining variations (adjusted R^2)	F	p	Explaining variables		
					Soil	Plant	Microbe
Austria	Fertilized	59.1	3.61	*	WFPS	Height	NRS
France	Fertilized	49.1	6.48	***	Porosity	RDMC; Root C:N	NRS; DEA
England	Fertilized	28.7	4.65	**	NH_4^+	RDMC	DEA
	Unfertilized	65.8	31.63	***	WFPS; Porosity	Root Diameter; Root C:N	NIP
All sites	Fertilized	62.7	32.42	***	Total C	Root Diameter; Root C:N	DEA
	All treatments	63.6	41.81	***	Total C	Root Diameter; RNC; Height	NIP; DEA; F:B ratio

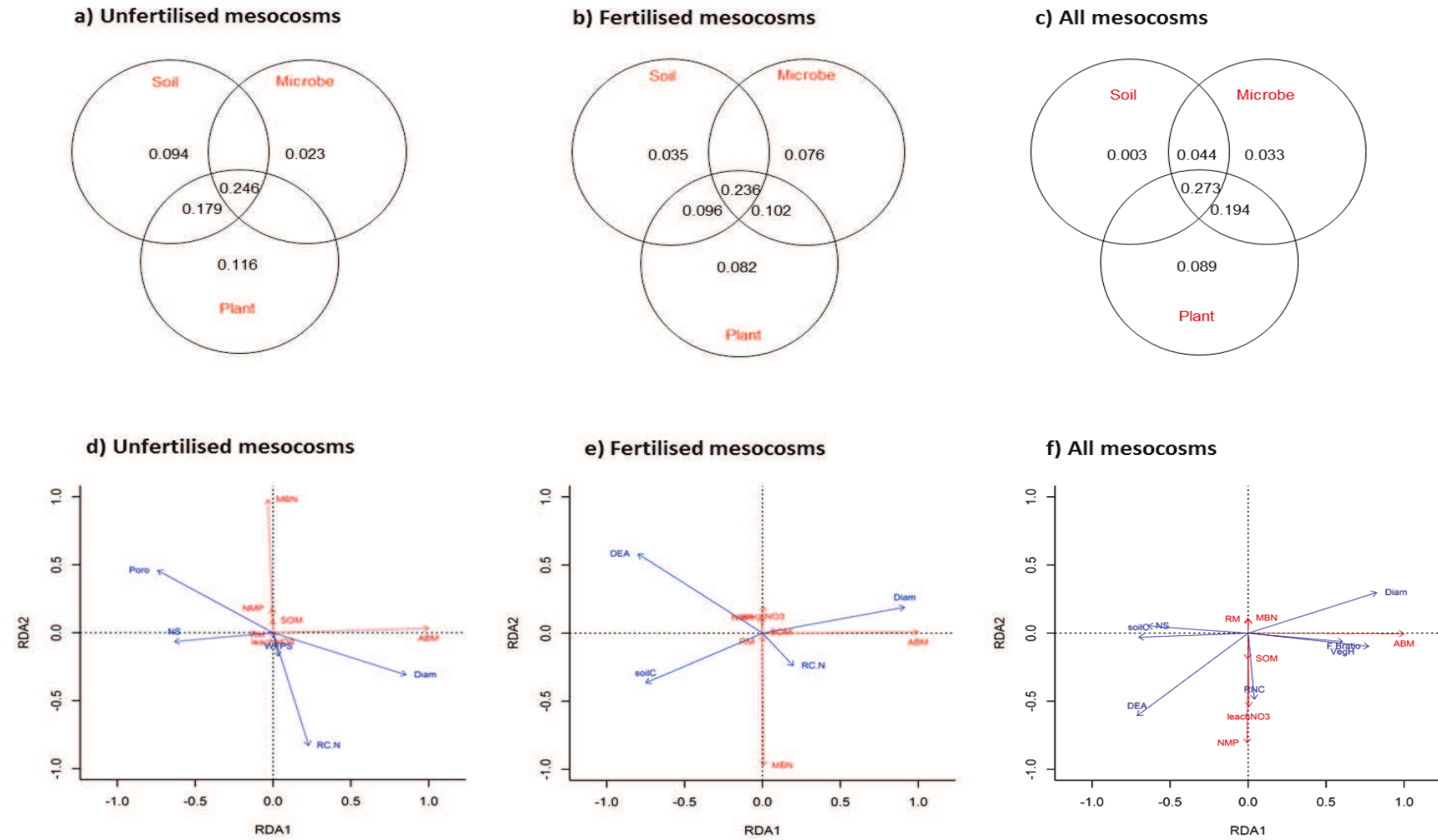
The percentage of variation explained by models within each site in fertilised mesocosms was less than for all sites together (59.1%, 49.1%, and 28.7%, and at Austrian French, and English sites respectively). Variables related to water availability were retained as soil explanatory variables at the Austrian and French sites (WFPS and porosity respectively), whereas soil NH_4^+ was selected at the English site. Below-ground plant traits were retained in the model for the English (RDMC) and French site (RDMC and Root C:N), while above-ground vegetative height was selected at the Austrian site. Microbial functional parameters retained for each of the three sites were related to denitrification processes, either NRS at the Austrian and French sites, or DEA at English and French sites (Table 2).

Relative contributions of soil abiotic properties, plant traits and microbial parameters, and of their interactions to ecosystem properties

The variance partitioning of ecosystem properties between soil, plant and microbial variables was similar for the three inter-site analyses regardless of fertilisation (Fig. 1a, 1b and 1c). In all cases, the 3-way interactions between soil abiotic properties, plant and microbial traits explained the largest amount of variance (23.6%, 24.6% and 27.3% for fertilised, unfertilised mesocosms, and all mesocosms pooled respectively). Two-way interactions involving plant traits also contributed substantially to variation in ecosystem properties (17.9%, 19.4% and 19.8% for unfertilised mesocosms, all mesocosms together and fertilised mesocosms respectively). Finally, the total contribution of plant functional traits to the variance in ecosystem properties was the highest in comparison with microbial or soil abiotic properties (54.1%, 51.6% and 55.6% for unfertilised mesocosms, fertilised mesocosms and analysis pooling all mesocosms respectively) (Fig 1a, 1b and 1c).

In contrast to the data set pooled across sites, within fertilised mesocosms at each site (Fig. 2a, 2b and 2c) three-way and two-way interactions did not contribute greatly to variation in ecosystem properties, and this result was true for all within site models excepted for analysis pooling all mesocosms on the UK site (Appendix 2). Instead, the greatest contribution was that of individual groups of drivers, namely microbial functional parameters at the Austrian site (30.3%; Fig. 2a), plant functional traits at the English site (15.8%; Fig. 2c), and an equal contributions of microbial functional parameters and soil abiotic properties at French site (i.e 21.5% and 21.3% respectively; Fig. 2b).

Figure 1. Inter-sites variation partitioning, with relative variance explained ($R^2_{adj.}$), of the individual (outside of the circle interceptions) and combined fractions (inside) of the different explanatory variables involved in the ecosystem properties variations, for a) unfertilised, b) fertilised, and c) all mesocosms. Redundancy analysis scores for ecosystem properties for d) unfertilised, e) fertilised, and f) all mesocosms. Abbreviations : aboveground biomass (ABM), root biomass (RM), soil microbial biomass N (MBN), nitrate leached (leachNO₃), soil nitrogen mineralization potential (NMP), soil organic matter content (SOM), soil water filled pore space (WFPS), total soil porosity (Poro), total soil carbon (SoilC), root diameter (Diam), root C:N ratio (RC.N), root nitrogen concentration (RNC), vegetative height (VegH), gene abundance of *Nitrospira* (NS), denitrification enzyme activity (DEA), fungi to bacteria ratio (F.Bratio).

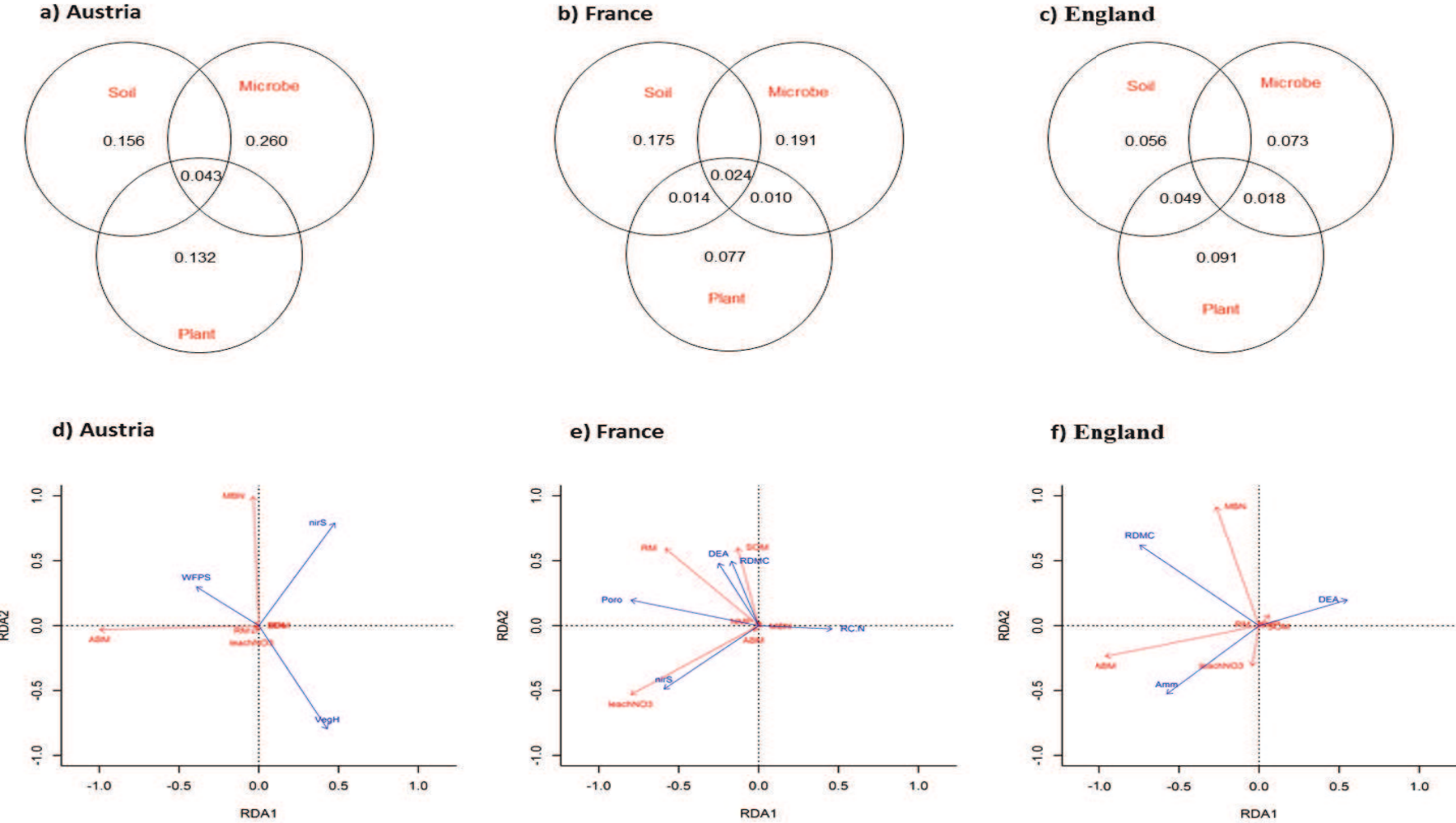


Linkages among ecosystem properties

Projections of ecosystem properties within the plane formed by the first two RDA axes were relatively similar whatever fertilisation in inter-sites analyses (Fig. 1d, 1e and 1f). In all cases, the first axis of RDA was only related to above-ground biomass (ABM) and was independent of all other ecosystem properties. Along this axis, ABM was related to root diameter in all cases, and additionally to vegetative height for the analysis pooling fertilised and unfertilised mesocosms (Fig. 1f). ABM was also negatively related to water availability (WFPS) and to the gene abundance of nitrifiers (NIP) in unfertilised mesocosms, to soil total C in fertilised mesocosms (Fig. 1d and 1e), and to NIP and soil total C for the analysis pooling fertilised and unfertilised mesocosms (Fig. 1f). The second axis of RDA for either fertilised or unfertilised mesocosms was only related to microbial biomass N (MBN) which was mainly opposed to potentially leached NO_3^- (Fig. 1d et 1e). This topology was broadly conserved in the analysis pooling fertilised and unfertilised mesocosms, where the second axis was related to MBN and root mass (RM), opposed to potential leaching of soil NO_3^- , N mineralization potential (NMP), and soil organic matter content (SOM). Finally, on this second axis MBN was related to root traits, with a positive association with root C:N and RNC for fertilised mesocosms and all mesocosms together respectively (Fig. 1e and 1f), but a negative association with root C:N for unfertilised mesocosms (Fig. 1d).

In fertilised mesocosms within the Austrian and the English site, consistent with inter-site analyses, the first axis was only related to ABM (Fig. 2d and 2f). ABM was positively associated with water availability (WFPS) at the Austrian site (Fig. 2d), and negatively associated with denitrifiers' potential activity (DEA) at the English site (Fig 2f). As in inter-site analyses, the second axis was related to MBN, which was negatively related to other ecosystem properties. MBN was positively associated with root dry matter content (RDMC) at the English site. In contrast, at the Austrian site it was positively associated with the gene abundance of denitrifiers (NRS), and negatively associated to plant above-ground vegetative height. The French site showed a different pattern with the first axis related to potentially leached soil NO_3^- , which was positively linked to NRS and to soil porosity and negatively linked to root C:N (Fig. 2e). The second axis was mainly related to SOM and RM, which were associated to DEA and RDMC. Lastly, these patterns of trade-off and/or bundles between ecosystem properties for individual sites remained overall consistent regardless of fertilisation (Appendix 3).

Figure 2. Variation partitioning, with relative variance explained ($R^2_{adj.}$), of the individual (outside of the circle interceptions) and combined fractions (inside) of the different explanatory variables involved in the ecosystem properties variations for fertilised mesocosm in a) Austria, b) France, and c) UK. Redundancy analysis scores for ecosystem properties for fertilised mesocosm in d) Austria, e) France, and f) UK. Abbreviations : aboveground biomass (ABM), root biomass (RM), microbial biomass N (MBN), nitrate leached (leachNO3), nitrogen mineralization potential (NMP), soil organic matter content (SOM), soil water filled pore space (WFPS), total soil porosity (Poro), soil ammonium content (Amm), vegetative height (VegH), root dry matter content (RDMC), root C:N ratio (RC.N), gene abundance of *nirS* (*nirS*), denitrification enzyme activity (DEA).



Discussion

To our knowledge, this is the first study examining for assembled plant communities the relative contribution to the variation of a set of ecosystem properties across three major groups of drivers of ecosystem functioning, namely soil abiotic properties, plant functional traits and microbial functional parameters. Overall, our results support the suggestion by recent studies of the importance of above-ground – below-ground interactions for ecosystem functioning (Wardle *et al.*, 2004; Van der Putten *et al.*, 2009; see also Bardgett & Wardle, 2010). Indeed, our inter-site analyses showed large 3-way interactions among these three groups of drivers (Fig. 1). However, there were differences across sites or fertilisation treatments in the relative contributions of each group. In models within individual sites independent contributions of each group of drivers prevailed (Fig. 2; Appendix 2), where variations in ecosystem properties were explained by a prevalent total contribution of microbial parameters at the Austrian site, a prevalent soil and microbial combined contribution at the French site, and a prevalent total contribution of plant traits at the English site. We hypothesise that these differences may be related to initial soil inorganic N availability of soil used at each site at the onset of the two years experiment, which was very low at the abandoned Austrian site ($11.7 \mu\text{g. g}^{-1}$ dry soil), intermediate at the lightly grazed French site ($14.5 \mu\text{g. g}^{-1}$ dry soil), and high at the long-term fertilised English site ($23.9 \mu\text{g. g}^{-1}$ dry soil) (Grigulis *et al.* 2013). Thus, under lower inorganic N availability, ecosystem processes would be mostly controlled by soil and microbial parameters, whereas under higher N availability, ecosystem processes would be predominantly controlled by plant parameters. Such a hypothesis would be consistent with patterns observed in the field at the same three sites (Grigulis *et al.*, 2013), and which suggested that ecosystem processes might be predominantly controlled by plant communities under higher N availability and associated fast nutrient cycling, and by microbial communities under lower inorganic N availability where microbial immobilization and nutrient retention prevailed.

Variations in multiple ecosystem properties in response to site initial soil inorganic N availability and fertilisation

The RDA projections revealed that, with the exception of the Lautaret site (Fig. 2e) when considered alone, the greatest variations across mesocosms in relation to plant traits, microbial functional parameters, and soil abiotic properties, captured by axis 1 of the RDA, regarded above-ground biomass (Fig. 1; Fig. 2d,f - axis 1). The second axis captured

variations among all measured soil ecosystem properties, which thus had responses to plant traits, microbial functional parameters, and soil abiotic properties that varied independently from those of ABM.

ABM was related to the three groups of drivers studied, even if the identity of individual selected variables differed between models. In the analyses pooling the three sites ABM was always related to root diameter regardless of fertilisation. This result concurs with two previous studies which detected effects of root allocation (root : shoot ratio, in mesocosms; Mokany *et al.*, 2008) or rooting depth (in the field; Schumacher & Roscher, 2009) on above-ground biomass production, although this was not verified for grassland monoliths where root specific length, tissue density or diameter had no significant effects on above-ground biomass production (Klump & Soussana 2009b). Together, they show the relevance of root, and not only leaf traits (e.g. Garnier *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2007; Laliberté & Tylianakis, 2012), which have been more often incorporated in trait-based analyses of above-ground biomass production. In addition, when considering fertilised and unfertilised mesocosms together, ABM was also related to vegetative height, consistent with previous field analyses across our three sites (Grigulis *et al.*, 2013), and at individual grassland sites (Ansquer *et al.*, 2009; Lienin & Kleyer, 2012; Butterfield & Suding, 2013), including Lautaret (Lavorel *et al.*, 2011). There was no consistent pattern across analyses in selected soil abiotic parameters and microbial functional parameters related to ABM. However, when retained, microbial functional parameters likely reflected indirect effects on ecosystem functioning through their responses to soil abiotic parameters and plant functional traits (Legay *et al.*, submitted). Denitrification parameters were mainly retained in fertilised treatments and in analyses pooling unfertilised and fertilised mesocosms at the UK site (Fig 2f – Appendix 6c), which had the highest initial soil inorganic N availability. ABM was also related to high nutrient and water availabilities (Bever *et al.* 1997; Hawkins *et al.*, 2003; Bonanomi *et al.*, 2006; Poirier *et al.*, 2012), whereas these soil parameters showed negative relationships with denitrification parameters (e.g. DEA). This last result was inconsistent with previous studies (Henry *et al.*, 2008; Attard *et al.*, 2011), but may be related to specific plant traits in our study. Indeed, reduced denitrification values at high nutrient and water supplies were paralleled by high RDMC. When high, this root trait reflects high root tissue density, which has been shown to limit labile C exudation (Valé *et al.*, 2005) and, therefore, heterotrophic activities such as denitrification. Nitrification parameters were retained in unfertilised mesocosms and in analyses pooling unfertilised and fertilised mesocosms for the inter-site analysis (Fig. 1a,c). Similar to denitrification parameters, nitrification parameters decreased when ABM increased,

which suggested that competition for ammonium occurred between plants and microbes (Skiba *et al.*, 2011). This was also supported by positive relationships between soil NH_4^+ or $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio and ABM in unfertilised mesocosms at the Austrian site (Appendix 4d), in fertilised mesocosm at UK site (Fig. 2c) and in the analyses pooling unfertilised and fertilised mesocosms at the Austrian and UK sites (Appendix 4f & 6f). This is consistent with studies demonstrating that species could preferentially uptake the most abundant resource in the soil, that is NH_4^+ in these mesocosms (Weigelt *et al.*, 2005, Aanderud & Bledsoe, 2009; Grassein *et al.*, submitted).

The fact that there were no strong contrasts in ABM across mesocosms with different functional composition or fertilisation levels at Lautaret site (Fig. 2b and Appendix 5) could be explained by individual characteristics of selected plant species. In fact, the two selected conservative species at the French site (i.e. *F. paniculata* and *A. millefolium*) showed a high aboveground biomass production, thus suggesting strong species identity effects rather than effects of functional composition (Díaz *et al.*, 2007). This particularity of *F. paniculata*, which although strongly conservative produces large biomass thanks to specific sugar reserves (Baptist *et al.*, 2013), was already reported for this site (Lavorel & Grigulis, 2012). The unexpectedly high productivity of *A. millefolium* may be explained by a response to defoliation with our mowing simulation at the end of the first season (Samuelson & Rood, 2011), leading to a large aboveground productivity whatever the fertilisation applied and the proportion of each species in plant communities. Instead of ABM, contrasts across mesocosms with different functional composition or fertilisation levels regarded soil ecosystem properties, primarily for potential leaching of soil NO_3^- , and independently from this for microbial biomass N. This finding was not expected since it suggests an independence of soil nutrient sequestration and nutrient loss, and was inconsistent with numerous studies which reported a negative relationship between these two ecosystem properties (De Vries *et al.*, 2011; De Vries & Bardgett, 2012; Grigulis *et al.*, 2013). We suggest that this result may be explained by soil N availability, since in unfertilised mesocosms and in the analyses pooling unfertilised and fertilised mesocosms (Appendix 5d,f), high inorganic N availabilities were related to high NO_3^- leaching (Cameron *et al.* 2013). In parallel, we observed that denitrification parameters were related either to potentially leached NO_3^- as well as to all other soil properties in fertilised mesocosms, or only to all other soil processes in unfertilised mesocosms (Qian & Cai, 2007; De Vries *et al.*, 2011; Grigulis *et al.*, 2013). Plant functional traits were also related to soil properties, with plant traits linked to exploitative strategies,

high RNC and root diameter (Craine *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2006), being mainly linked to high NO_3^- leaching. Conversely, plant traits linked to conservative strategies such as high RDMC (Craine *et al.*, 2001) were related to soil properties reflecting soil nutrient retention such as high MBN (Bardgett *et al.*, 2003; Robson *et al.*, 2010). These findings suggest that, at the French site, tight linkages between plants and soil microbes could drive N retention and losses in the ecosystem in response to soil nutrient availability (De Vries *et al.*, 2012, Grigulis *et al.*, 2013).

In the other sites and in the inter-site analysis (Fig. 1 & Fig. 2a,c), the second axes of RDA related to soil ecosystem properties can be interpreted to identify bundles and trade-offs among them. Overall, and although contrasts along the axes differed between sites and treatments, a negative relationship between MBN and potentially leached NO_3^- was observed, suggesting a trade-off between inorganic N sequestration and loss (De Vries *et al.*, 2012). These two ecosystem properties were primarily related to plant functional traits, and particularly root functional traits, which implied that the plant economics spectrum, defined as a trade-off between conservation of resources in long-lived tissues and acquisition of resources by tissue with high turn-over (Wright *et al.*, 2004; Freschet *et al.*, 2010), would scale to soil ecosystem properties in a way similar to how the leaf economics spectrum scales to above-ground biomass productivity or litter decomposition (Lavorel & Grigulis, 2012). Indeed, in some models, high soil MBN (and also low potential of soil NO_3^- leaching) were related to root traits characteristic of high root biomass or root surface exchange, namely low root C:N (Craine *et al.*, 2003) and high SRL (Ryser, 2006), which both suggest a stimulation of the soil microbial biomass as they indicate an improved supply of nutrients (Paterson, 2003; Jones *et al.* 2004). Although there was no clear pattern, this strong involvement of root traits supports our assumption that they participate in many ecosystem processes (Craine *et al.*, 2002; Klumpp *et al.*, 2009b), through their influences also reported on root productivity (Craine, 2009), soil microbial biomass (Orwin *et al.*, 2010), soil organic matter decomposition (Kuziyakov, 2006) and nutrient cycling (Denef *et al.*, 2009). Finally, even if they showed fewer relationships in the various analyses, nutrient availabilities (e.g. NH_4^+) and microbial functional parameters (e.g. denitrification) were also involved in these below-ground ecosystem properties, as reported in other studies (Qian & Cai, 2007; Gordon *et al.*, 2008; Cameron *et al.*, 2013).

Conclusion

Collectively these results suggest that ecosystem properties were driven by simultaneous effects of soil abiotic properties, plant functional traits and microbial functional parameters. The relative contribution of each of these three groups of drivers varied with fertilisation and initial soil inorganic N availability. Overall, greater above-ground biomass was related to higher soil nutrient availability, larger root diameter and vegetative height, and low NEA and DEA. In nutrient poor soils, prevailing ecosystem properties such as MBN were controlled by soil abiotic properties and microbial communities, whereas in nutrient rich soils, prevailing ecosystem properties such as potential of soil NO_3^- leaching were controlled by soil abiotic properties and plant communities. Nutrient retention properties (high MBN) were rather related to high RDMC whilst nutrient losses were related to high RNC, soil nutrient availability and DEA. Together, these results point to key markers of N cycling in grasslands. These included soil water and nutrient availability, microbial denitrification parameters, as well as root functional traits. The latter could represent the most relevant markers since they were retained in most models and related to ecosystem processes that were most responsive to mesocosm functional composition and soil conditions. Yet, such markers still need to be tested in field studies taking into account spatial and temporal variation of ecosystem properties. Furthermore, beyond testing these patterns for other grassland sites, more in-depth studies are needed on mechanisms underpinning the interactions among soil resources, plant traits and microbial properties that determine N cycling.

References

- Aanderud, Z. T. and C. S. Bledsoe. 2009. Preferences for N-15-ammonium, N-15-nitrate, and N-15-glycine differ among dominant exotic and subordinate native grasses from a California oak woodland. *Environmental And Experimental Botany* **65**:205-209.
- Ansquer, P., M. Duru, J. P. Theau, and P. Cruz. 2009. Functional traits as indicators of fodder provision over a short time scale in species-rich grasslands. *Annals Of Botany* **103**:117-126.
- Attard, E., S. Recous, A. Chabbi, C. De Berranger, N. Guillaumaud, J. Labreuche, L. Philippot, B. Schmid, and X. Le Roux. 2011. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology* **17**:1975-1989.
- Baptist, F., H. Secher-Fromell, F. Viard-Cretat, I. Aranjuelo, J. C. Clement, A. Creme, M. Desclos, P. Laine, S. Nogues, and S. Lavorel. 2013. Carbohydrate and nitrogen stores in *Festuca paniculata* under mowing explain dominance in subalpine grasslands. *Plant Biology* **15**:395-404.
- Bardgett, R. D., P. J. Hobbs, and A. Frostegard. 1996. Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology And Fertility Of Soils* **22**:261-264.
- Bardgett, R. D. and E. McAlister. 1999. The measurement of soil fungal : bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology And Fertility Of Soils* **29**:282-290.
- Bardgett, R. D. and D. A. Wardle. 2003. Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. *Ecology* **84**:2258-2268.
- Barrios, E. 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* **64**:269-285.
- Bever, J. D., K. M. Westover, and J. Antonovics. 1997. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *Journal Of Ecology* **85**:561-573.
- Blanchet, F. G., P. Legendre, and D. Borcard. 2008. Forward selection of explanatory variables. *Ecology* **89**:2623-2632.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**:911-917.
- Bonanomi, G., S. Caporaso, and M. Allegranza. 2006. Short-term effects of nitrogen enrichment, litter removal and cutting on a Mediterranean grassland. *Acta Oecologica-International Journal Of Ecology* **30**:419-425.

- Bremer, C., G. Braker, D. Matthies, A. Reuter, C. Engels, and R. Conrad. 2007. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of nirK-Type denitrifier communities in soil. *Applied And Environmental Microbiology* **73**:6876-6884.
- Butterfield, B. J. and K. N. Suding. 2013. Single-trait functional indices outperform multi-trait indices in linking environmental gradients and ecosystem services in a complex landscape. *Journal Of Ecology* **101**:9-17.
- Cameron, K. C., H. J. Di, and J. L. Moir. 2013. Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of Applied Biology* **162**:145-173.
- Casanoves, F., L. Pla, J. A. Di Rienzo, and S. Diaz. 2011. FDiversity: a software package for the integrated analysis of functional diversity. *Methods in Ecology and Evolution* **2**:233-237.
- Cleveland, C. C., A. R. Townsend, D. S. Schimel, H. Fisher, R. W. Howarth, L. O. Hedin, S. S. Perakis, E. F. Latty, J. C. Von Fischer, A. Elseroad, and M. F. Wasson. 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N-2) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* **13**:623-645.
- Cornelissen, J. H. C., S. Lavorel, E. Garnier, S. Diaz, N. Buchmann, D. E. Gurvich, P. B. Reich, H. ter Steege, H. D. Morgan, M. G. A. van der Heijden, J. G. Pausas, and H. Poorter. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal Of Botany* **51**:335-380.
- Craine, J. M., J. Froehle, G. D. Tilman, D. A. Wedin, and F. S. Chapin. 2001. The relationships among root and leaf traits of 76 grassland species and relative abundance along fertility and disturbance gradients. *Oikos* **93**:274-285.
- Craine, J. M., D. Tilman, D. Wedin, P. Reich, M. Tjoelker, and J. Knops. 2002. Functional traits, productivity and effects on nitrogen cycling of 33 grassland species. *Functional Ecology* **16**:563-574.
- Craine, J. M., D. A. Wedin, F. S. Chapin, and P. B. Reich. 2003. The dependence of root system properties on root system biomass of 10 North American grassland species. *Plant And Soil* **250**:39-47.
- Dassonville, N., N. Guillaumaud, F. Piola, P. Meerts, and F. Poly. 2011. Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions* **13**:1115-1133.
- De Deyn, G. B., H. Quirk, Z. Yi, S. Oakley, N. J. Ostle, and R. D. Bardgett. 2009. Vegetation composition promotes carbon and nitrogen storage in model grassland communities of contrasting soil fertility. *Journal Of Ecology* **97**:864-875.
- de Vries, F. T. and R. D. Bardgett. 2012. Plant-microbial linkages and ecosystem nitrogen retention: lessons for sustainable agriculture. *Frontiers in Ecology and the Environment* **10**:425-432.

- de Vries, F. T., J. Bloem, H. Quirk, C. J. Stevens, R. Bol, and R. D. Bardgett. 2012. Extensive Management Promotes Plant and Microbial Nitrogen Retention in Temperate Grassland. *Plos One* **7**.
- de Vries, F. T., J. W. van Groenigen, E. Hoffland, and J. Bloem. 2011. Nitrogen losses from two grassland soils with different fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry* **43**:997-1005.
- Denef, K., D. Roobroeck, M. Wadu, P. Lootens, and P. Boeckx. 2009. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* **41**:144-153.
- Di, H. J. and K. C. Cameron. 2002. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **64**:237-256.
- Diaz, S., S. Lavorel, F. de Bello, F. Quetier, K. Grigulis, and M. Robson. 2007. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **104**:20684-20689.
- Dominati, E., M. Patterson, and A. Mackay. 2010. A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics* **69**:1858-1868.
- Dray, S. and A. B. Dufour. 2007. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**:1-20.
- Freschet, G. T., J. H. C. Cornelissen, R. S. P. van Logtestijn, and R. Aerts. 2010. Evidence of the 'plant economics spectrum' in a subarctic flora. *Journal Of Ecology* **98**:362-373.
- Garnier, E., J. Cortez, G. Billes, M. L. Navas, C. Roumet, M. Debussche, G. Laurent, A. Blanchard, D. Aubry, A. Bellmann, C. Neill, and J. P. Toussaint. 2004. Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology* **85**:2630-2637.
- Gordon, H., P. M. Haygarth, and R. D. Bardgett. 2008. Drying and rewetting effects on soil microbial community composition and nutrient leaching. *Soil Biology & Biochemistry* **40**:302-311.
- Grayston, S. J., G. S. Griffith, J. L. Mawdsley, C. D. Campbell, and R. D. Bardgett. 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* **33**:533-551.
- Grigulis, K., S. Lavorel, U. Krainer, N. Legay, C. Baxendale, M. Dumont, E. Kastl, C. Arnoldi, R. D. Bardgett, F. Poly, T. Pommier, M. Schlöter, U. Tappeiner, M. Bahn, and J.-C. Clément. 2013. Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services. *Journal Of Ecology* **101**:47-57.
- Grime, J. P. 1977. Evidence For Existence Of 3 Primary Strategies In Plants And Its Relevance To Ecological And Evolutionary Theory. *American Naturalist* **111**:1169-1194.
- Hamilton, E. W. and D. A. Frank. 2001. Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass. *Ecology* **82**:2397-2402.

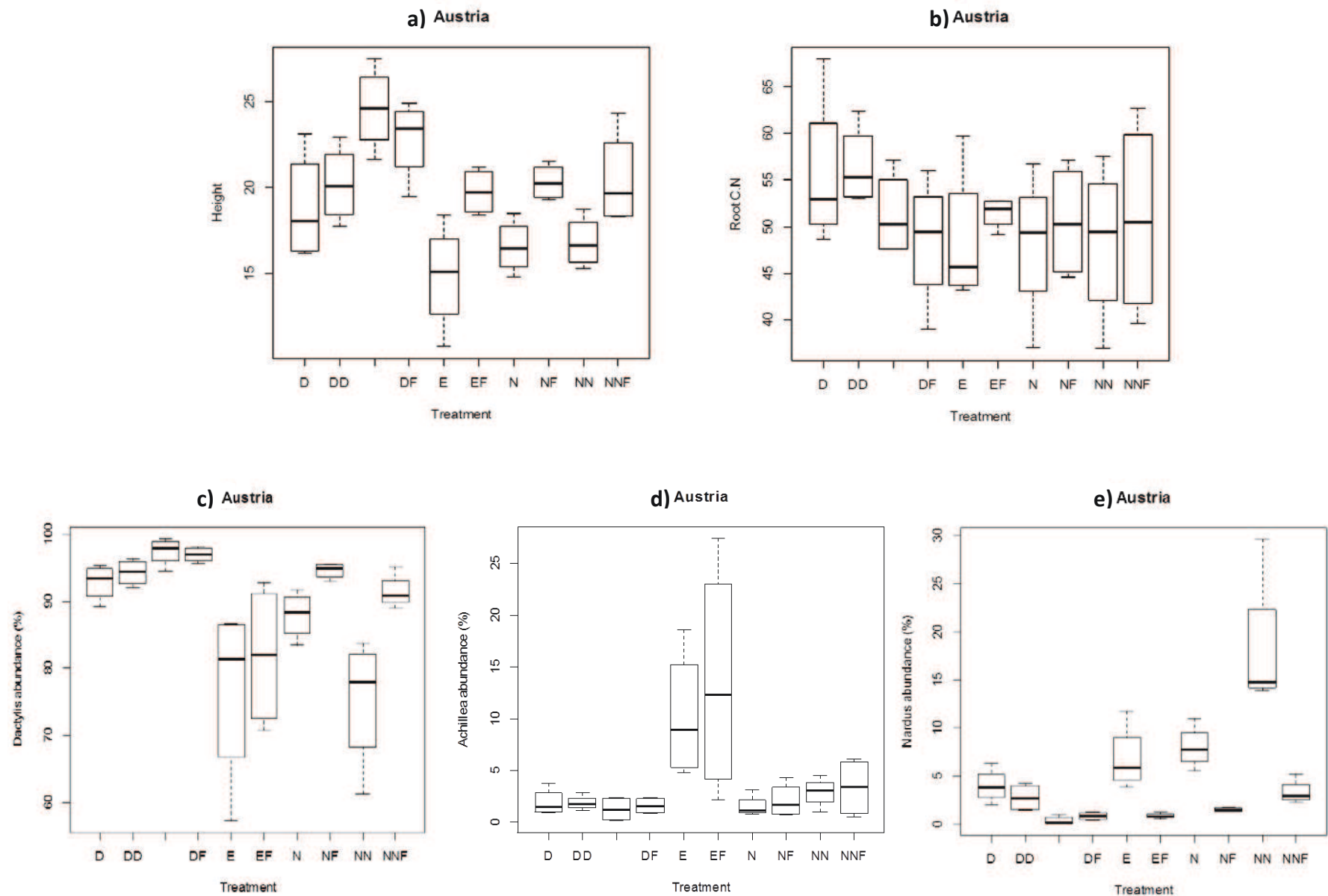
- Hawkins, B. A., R. Field, H. V. Cornell, D. J. Currie, J. F. Guegan, D. M. Kaufman, J. T. Kerr, G. G. Mittelbach, T. Oberdorff, E. M. O'Brien, E. E. Porter, and J. R. G. Turner. 2003. Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. *Ecology* **84**:3105-3117.
- Henry, S., S. Texier, S. Hallet, D. Bru, C. Dambreville, D. Cheneby, F. Bizouard, J. C. Germon, and L. Philippot. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environmental Microbiology* **10**:3082-3092.
- Hill, J. O., R. J. Simpson, A. D. Moore, and D. F. Chapman. 2006. Morphology and response of roots of pasture species to phosphorus and nitrogen nutrition. *Plant And Soil* **286**:7-19.
- Hodge, A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**:9-24.
- Jones, D. L., A. Hodge, and Y. Kuzyakov. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* **163**:459-480.
- Jones, D. L. and V. B. Willett. 2006. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:991-999.
- Klumpp, K., S. Fontaine, E. Attard, X. Le Roux, G. Gleixner, and J. F. Soussana. 2009. Grazing triggers soil carbon loss by altering plant roots and their control on soil microbial community. *Journal Of Ecology* **97**:876-885.
- Klumpp, K. and J. F. Soussana. 2009. Using functional traits to predict grassland ecosystem change: a mathematical test of the response-and-effect trait approach. *Global Change Biology* **15**:2921-2934.
- Koper, T. E., J. M. Stark, M. Y. Habteselassie, and J. M. Norton. 2010. Nitrification exhibits Haldane kinetics in an agricultural soil treated with ammonium sulfate or dairy-waste compost. *Fems Microbiology Ecology* **74**:316-322.
- Kuzyakov, Y. 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:425-448.
- Laliberte, E. and J. M. Tylianakis. 2012. Cascading effects of long-term land-use changes on plant traits and ecosystem functioning. *Ecology* **93**:145-155.
- Laughlin, D. C. 2011. Nitrification is linked to dominant leaf traits rather than functional diversity. *Journal Of Ecology* **99**:1091-1099.
- Lavorel, S. 2013. Plant functional effects on ecosystem services. *Journal Of Ecology* **101**:4-8.
- Lavorel, S. and E. Garnier. 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* **16**:545-556.
- Lavorel, S. and K. Grigulis. 2012. How fundamental plant functional trait relationships scale-up to trade-offs and synergies in ecosystem services. *Journal Of Ecology* **100**:128-140.

- Lavorel, S., K. Grigulis, P. Lamarque, M. P. Colace, D. Garden, J. Girel, G. Pellet, and R. Douzet. 2011. Using plant functional traits to understand the landscape distribution of multiple ecosystem services. *Journal Of Ecology* **99**:135-147.
- Le Roux, X., F. Poly, P. Currey, C. Commeaux, B. Hai, G. W. Nicol, J. I. Prosser, M. Schlöter, E. Attard, and K. Klumpp. 2008. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *Isme Journal* **2**:221-232.
- Le Roux, X., B. Schmid, F. Poly, R. L. Barnard, P. A. Niklaus, N. Guillaumaud, M. Habekost, Y. Oelmann, L. Philippot, J. F. Salles, M. Schlöter, S. Steinbeiss, and A. Weigelt. 2013. Soil Environmental Conditions and Microbial Build-Up Mediate the Effect of Plant Diversity on Soil Nitrifying and Denitrifying Enzyme Activities in Temperate Grasslands. *Plos One* **8**:e61069.
- Legendre, P., D. Borcard, and P. R. Peres-Neto. 2005. Analyzing beta diversity: Partitioning the spatial variation of community composition data. *Ecological Monographs* **75**:435-450.
- Mason, N. W. H., K. MacGillivray, J. B. Steel, and J. B. Wilson. 2003. An index of functional diversity. *Journal Of Vegetation Science* **14**:571-578.
- Minden, V. and M. Kleyer. 2011. Testing the effect-response framework: key response and effect traits determining above-ground biomass of salt marshes. *Journal Of Vegetation Science* **22**:387-401.
- Mokany, K., J. Ash, and S. Roxburgh. 2008. Functional identity is more important than diversity in influencing ecosystem processes in a temperate native grassland. *Journal Of Ecology* **96**:884-893.
- Orwin, K. H., S. M. Buckland, D. Johnson, B. L. Turner, S. Smart, S. Oakley, and R. D. Bardgett. 2010. Linkages of plant traits to soil properties and the functioning of temperate grassland. *Journal Of Ecology* **98**:1074-1083.
- Paterson, E. 2003. Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. *European Journal of Soil Science* **54**:741-750.
- Patra, A. K., L. Abbadie, A. Clays-Josserand, V. Degrange, S. J. Grayston, N. Guillaumaud, P. Loiseau, F. Louault, S. Mahmood, S. Nazaret, L. Philippot, F. Poly, J. I. Prosser, and X. Le Roux. 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology* **8**:1005-1016.
- Poirier, M., J. L. Durand, and F. Volaire. 2012. Persistence and production of perennial grasses under water deficits and extreme temperatures: importance of intraspecific vs. interspecific variability. *Global Change Biology* **18**:3632-3646.
- Pontes, L. D. S., J. F. Soussana, F. Louault, D. Andueza, and P. Carrere. 2007. Leaf traits affect the above-ground productivity and quality of pasture grasses. *Functional Ecology* **21**:844-853.

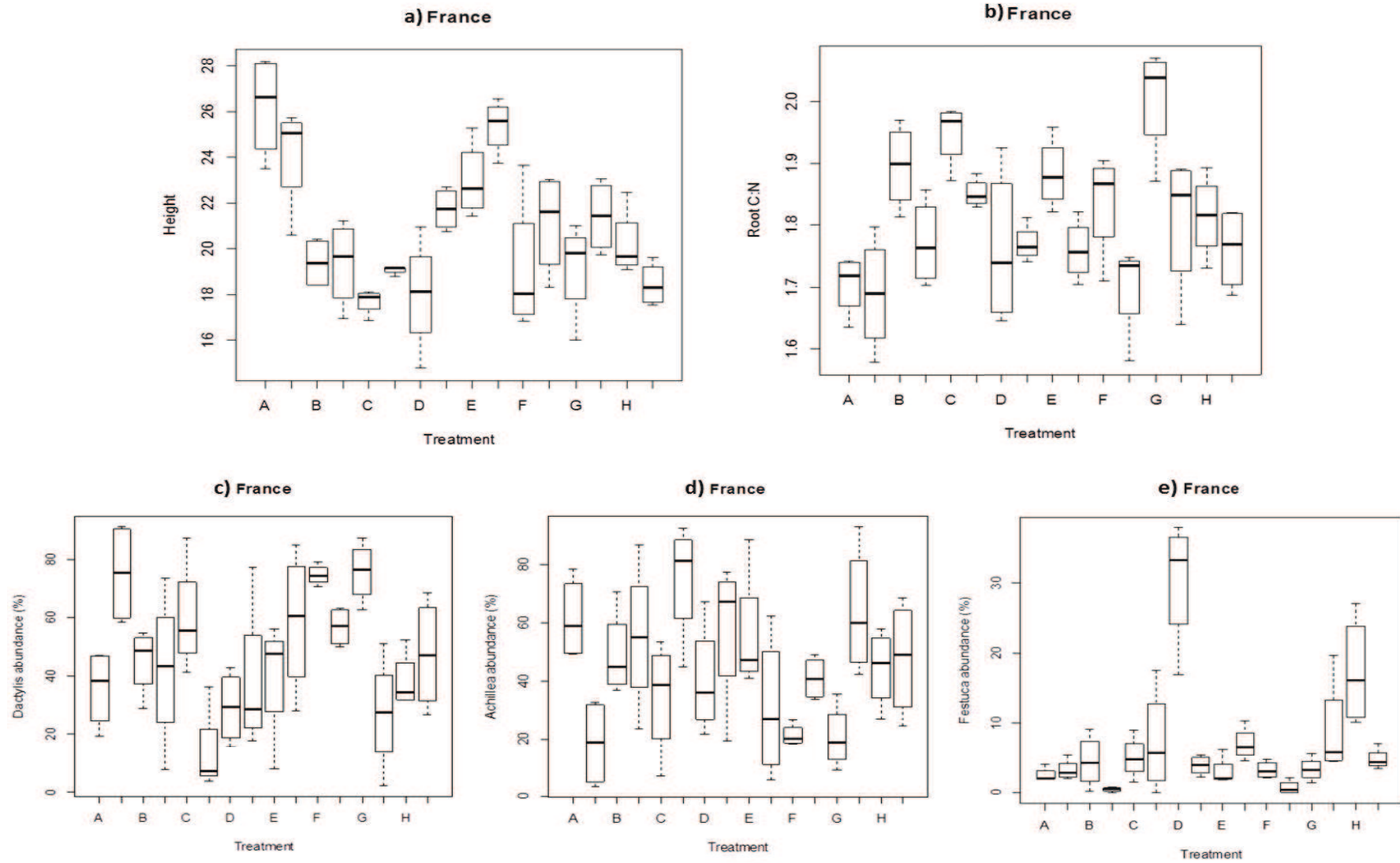
- Poorter, H. and R. De Jong. 1999. A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytologist* **143**:163-176.
- Qian, C. and Z. Cai. 2007. Leaching of nitrogen from subtropical soils as affected by nitrification potential and base cations. *Plant And Soil* **300**:197-205.
- Robson, T. M., S. Lavorel, J. C. Clement, and X. Le Roux. 2007. Neglect of mowing and manuring leads to slower nitrogen cycling in subalpine grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* **39**:930-941.
- Ryser, P. 2006. The mysterious root length. *Plant And Soil* **286**:1-6.
- Samuelson, G. M. and S. B. Rood. 2011. Elevated sensitivity: riparian vegetation in upper mountain zones is especially vulnerable to livestock grazing. *Applied Vegetation Science* **14**:596-606.
- Schumacher, J. and C. Roscher. 2009. Differential effects of functional traits on aboveground biomass in semi-natural grasslands. *Oikos* **118**:1659-1668.
- Seguin, P., A. F. Mustafa, and C. C. Sheaffer. 2002. Effects of soil moisture deficit on forage quality, digestibility, and protein fractionation of Kura clover. *Journal of Agronomy and Crop Science* **188**:260-266.
- Skiba, M. W., T. S. George, E. M. Baggs, and T. J. Daniell. 2011. Plant influence on nitrification. *Biochemical Society Transactions* **39**:275-278.
- Tilman, D. 1985. The Resource-Ratio Hypothesis Of Plant Succession. *American Naturalist* **125**:827-852.
- Vale, M., C. Nguyen, E. Dambrine, and J. L. Dupouey. 2005. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. *Soil Biology & Biochemistry* **37**:2329-2333.
- van der Heijden, M. G. A., R. D. Bardgett, and N. M. van Straalen. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**:296-310.
- van der Putten, W. H., R. D. Bardgett, P. C. de Ruiter, W. H. G. Hol, K. M. Meyer, T. M. Bezemer, M. A. Bradford, S. Christensen, M. B. Eppinga, T. Fukami, L. Hemerik, J. Molofsky, M. Schadler, C. Scherber, S. Y. Strauss, M. Vos, and D. A. Wardle. 2009. Empirical and theoretical challenges in aboveground-belowground ecology. *Oecologia* **161**:1-14.
- Vance, E. D., P. C. Brookes, and D. S. Jenkinson. 1987. An Extraction Method For Measuring Soil Microbial Biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry* **19**:703-707.
- Vitousek, P. M., J. D. Aber, R. W. Howarth, G. E. Likens, P. A. Matson, D. W. Schindler, W. H. Schlesinger, and D. Tilman. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications* **7**:737-750.

- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. van der Putten, and D. H. Wall. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**:1629-1633.
- Waring, S. A. and J. M. Bremner. 1964. AMMONIUM PRODUCTION IN SOIL UNDER WATERLOGGED CONDITIONS AS INDEX OF NITROGEN AVAILABILITY. *Nature* **201**:951-&.
- Weigelt, A., R. Bol, and R. D. Bardgett. 2005. Preferential uptake of soil nitrogen forms by grassland plant species. *Oecologia* **142**:627-635.
- White, D. C., W. M. Davis, J. S. Nickels, J. D. King, and R. J. Bobbie. 1979. DETERMINATION OF THE SEDIMENTARY MICROBIAL BIOMASS BY EXTRACTABLE LIPID PHOSPHATE. *Oecologia* **40**:51-62.
- Wienhold, B. J. 2007. Comparison of laboratory methods and an in situ method for estimating nitrogen mineralization in an irrigated silt-loam soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **38**:1721-1732.
- Wookey, P. A., R. Aerts, R. D. Bardgett, F. Baptist, K. A. Brathen, J. H. C. Cornelissen, L. Gough, I. P. Hartley, D. W. Hopkins, S. Lavorel, and G. R. Shaver. 2009. Ecosystem feedbacks and cascade processes: understanding their role in the responses of Arctic and alpine ecosystems to environmental change. *Global Change Biology* **15**:1153-1172.
- Wright, I. J., P. B. Reich, M. Westoby, D. D. Ackerly, Z. Baruch, F. Bongers, J. Cavender-Bares, T. Chapin, J. H. C. Cornelissen, M. Diemer, J. Flexas, E. Garnier, P. K. Groom, J. Gulias, K. Hikosaka, B. B. Lamont, T. Lee, W. Lee, C. Lusk, J. J. Midgley, M. L. Navas, U. Niinemets, J. Oleksyn, N. Osada, H. Poorter, P. Poot, L. Prior, V. I. Pyankov, C. Roumet, S. C. Thomas, M. G. Tjoelker, E. J. Veneklaas, and R. Villar. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* **428**:821-827.
- Zeller, V., M. Bahn, M. Aichner, and U. Tappeiner. 2000. Impact of land-use change on nitrogen mineralization in subalpine grasslands in the Southern Alps. *Biology And Fertility Of Soils* **31**:441-448.

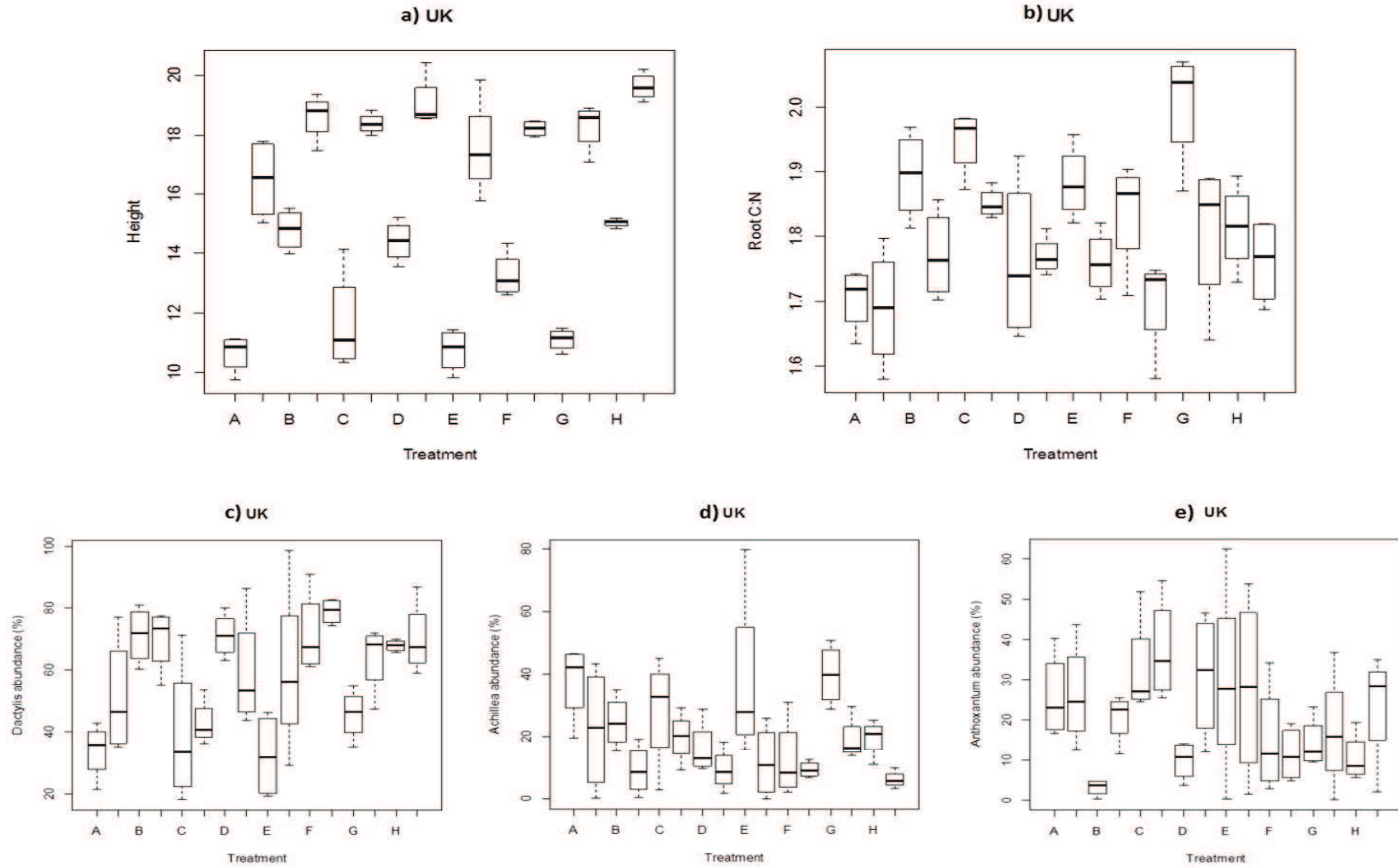
Appendix 1. Boxplots of a) community weighted means of vegetative height, b) root carbon: nitrogen ratio, species abundances of c) *Dactylis glomerata*, d) *Achillea millefolium* and e) *Nardus stricta*. The mean value of each treatment for unfertilized mesocosm (D,DD,E,N and NN) and fertilised mesocosms (DF,DDF,EF,NF,NNF).



Appendix 2. Boxplots of a) community weighted means of vegetative height, b) root carbon: nitrogen ratio, species abundances of c) *Dactylis glomerata*, d) *Achillea millefolium* and e) *Festuca paniculata*. The mean value of each treatment for unfertilized mesocosm (A,B,C,D,E,F,G,H) and fertilised mesocosms (AF,BF,CF,DF,EF,FF,GF,HF).



Appendix 3. Boxplots of a) community weighted means of vegetative height, b) root carbon: nitrogen ratio, species abundances of c) *Dactylis glomerata*, d) *Achillea millefolium* and e) *Anthoxanthum odoratum*. The mean value of each treatment for unfertilized mesocosm (A,B,C,D,E,F,G,H) and fertilised mesocosms (AF,BF,CF,DF,EF,FF,GF,HF).



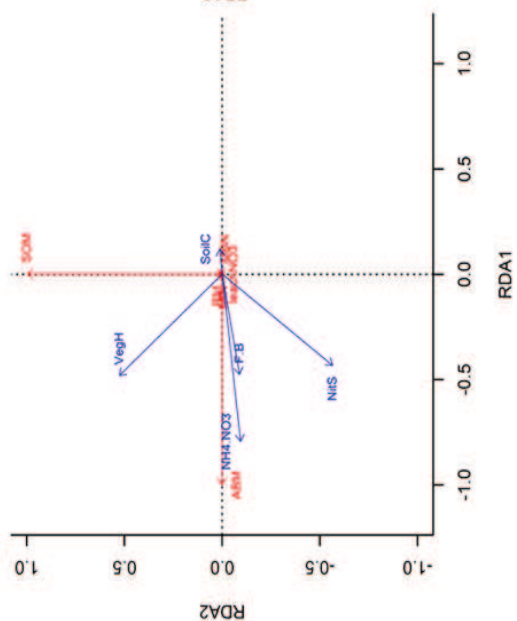
Appendix 4. Redundancy analysis scores for ecosystem properties at Austria site for a) unfertilised, b) fertilised, and c) all mesocosms. Abbreviations : aboveground biomass (ABM), root biomass (RM), microbial biomass N (MBN), nitrate leached (leachNO₃), nitrogen mineralization potential (NMP), soil organic matter (SOM), total soil carbon (SoilC), soil ammonium to nitrate ratio (NH₄.NO₃), in situ ammonium absorbed in resin (NH₄sorption), dissolved inorganic nitrogen (DIN), water filled pore space (WFPS), vegetative height (VegH), specific root length (SRL), fungi to bacteria ratio (F.B), gene abundance of *Nitrospira* (NitS), gene abundance of *nirS* (nirS). Variation partitioning with relative variance explained ($R^2_{adj.}$) of the various (outside of the circle interceptions) and combined fractions (inside) of the different explanatory variable involved in the ecosystem properties variations, for d) unfertilised, e) fertilised, and f) all mesocosms.

Appendix 5. Redundancy analysis scores for ecosystem properties at French site for a) unfertilised, b) fertilised, and c) all mesocosms. Abbreviations : aboveground biomass (ABM), root biomass (RM), microbial biomass N (MBN), nitrate leached (leachNO₃), nitrogen mineralization potential (NMP), soil organic matter (SOM), soil nitrate (nitrate), soil ammonium (Ammonium), total soil nitrogen (SoilN), in situ nitrate absorbed in resin (NO₃sorption), total soil porosity (Poro), water filled pore space (WFPS), root diameter (Diam), root dry matter content (RDMC), root C:N ratio (RC.N), leaf nitrogen concentration (LNC), denitrification enzyme activity (DEA), gene abundance of *nirS* (nirS), kinetic parameters of nitrification enzyme activity (Vmax). Variation partitioning with relative variance explained ($R^2_{adj.}$) of the various (outside of the circle interceptions) and combined fractions (inside) of the different explanatory variable involved in the ecosystem properties variations, for d) unfertilised, e) fertilised, and f) all mesocosms.

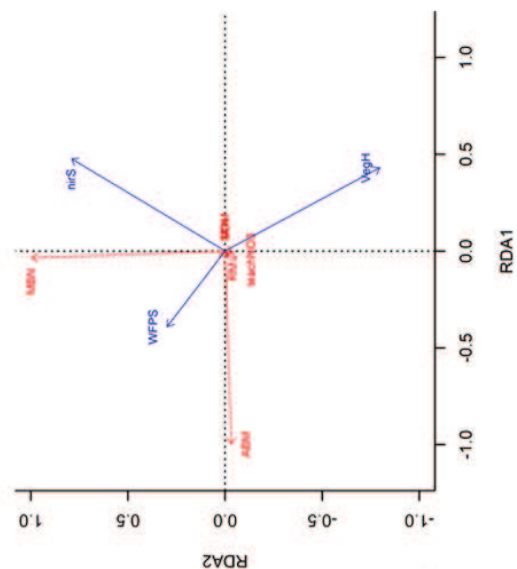
Appendix 6. Redundancy analysis scores for ecosystem properties at English site for a) unfertilised, b) fertilised, and c) all mesocosms. Abbreviations : aboveground biomass (ABM), root biomass (RM), microbial biomass N (MBN), nitrate leached (leachNO₃), nitrogen mineralization potential (NMP), soil organic matter (SOM), water filled pore space (WFPS), soil ammonium (Amm), specific root length (SRL), root dry matter content (RDMC), fungi to bacteria ratio (F.B), denitrification enzyme activity (DEA). Variation partitioning with relative variance explained ($R^2_{adj.}$) of the various (outside of the circle interceptions) and combined fractions (inside) of the different explanatory variable involved in the ecosystem properties variations, for d) unfertilised, e) fertilised, and f) all mesocosms.

Appendix 4.

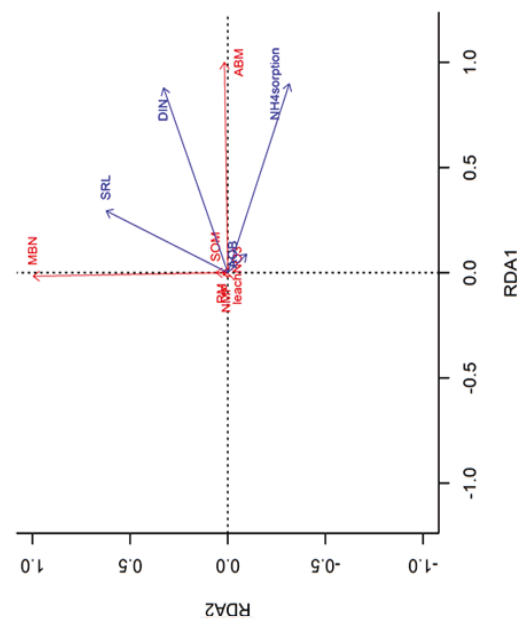
a) Unfertilised mesocosms



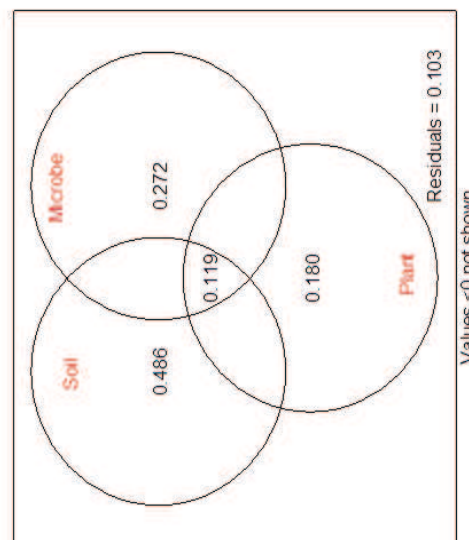
b) Fertilised mesocosms



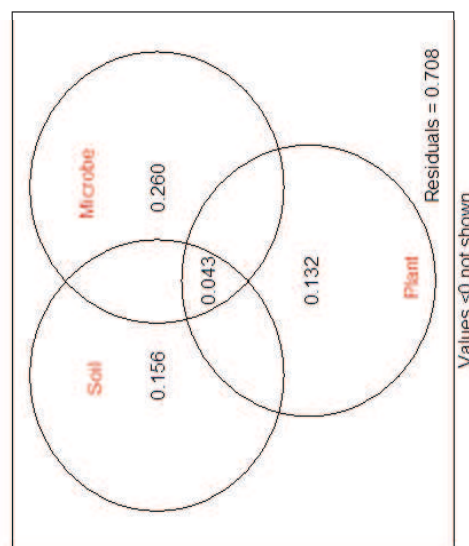
c) All mesocosms



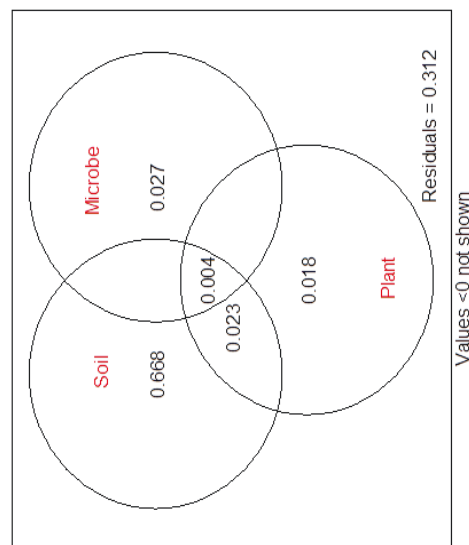
d) Unfertilised mesocosms



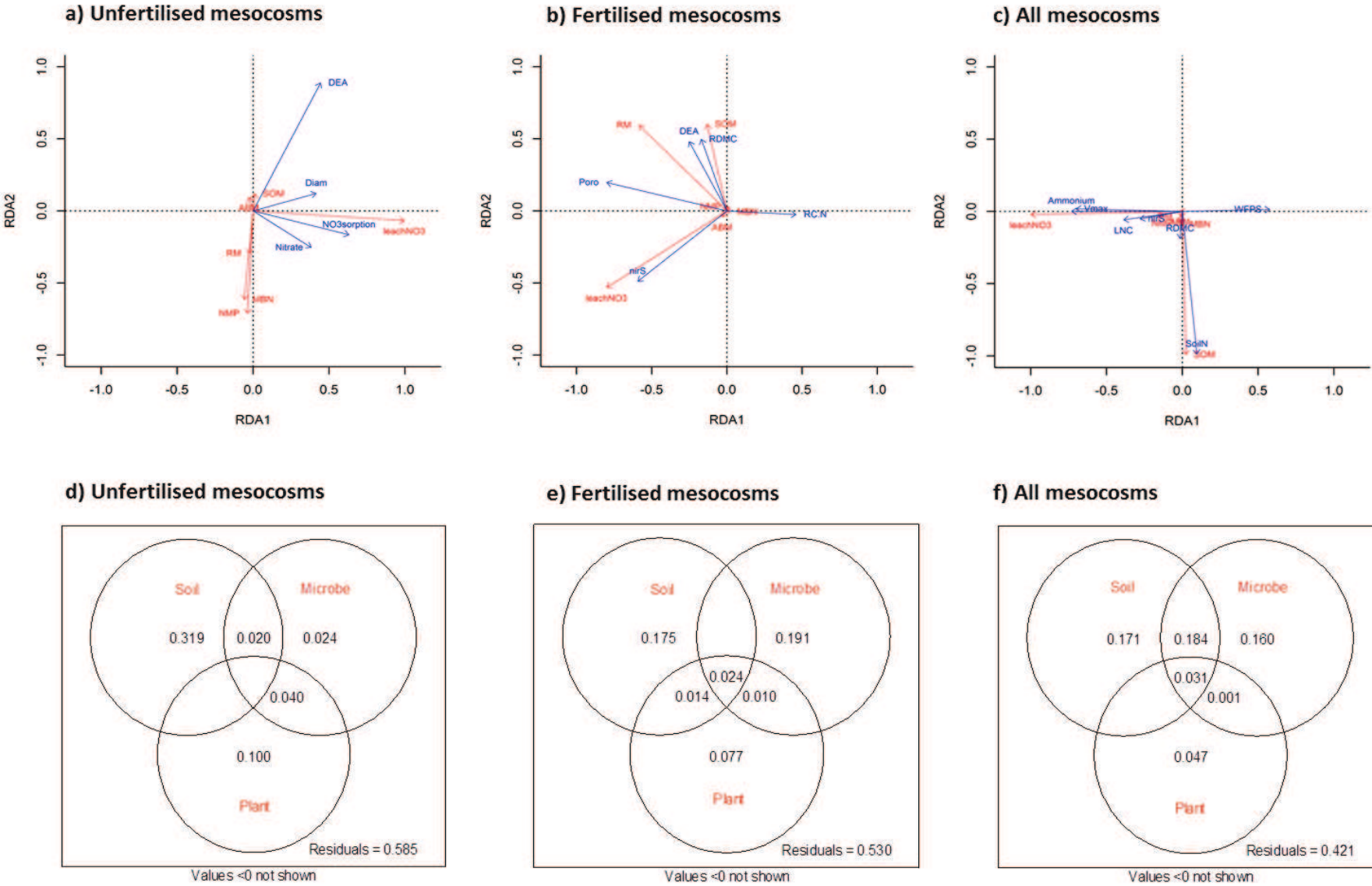
e) Fertilised mesocosms



f) All mesocosms

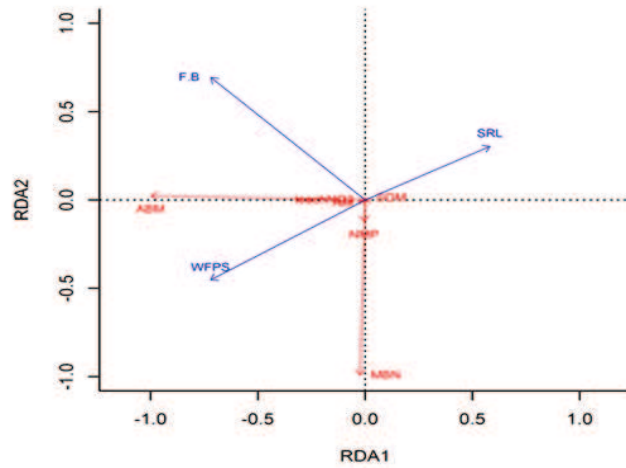


Appendix 5.

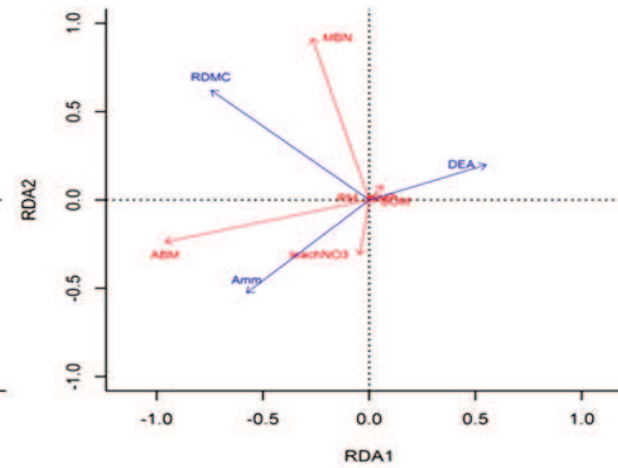


Appendix 6.

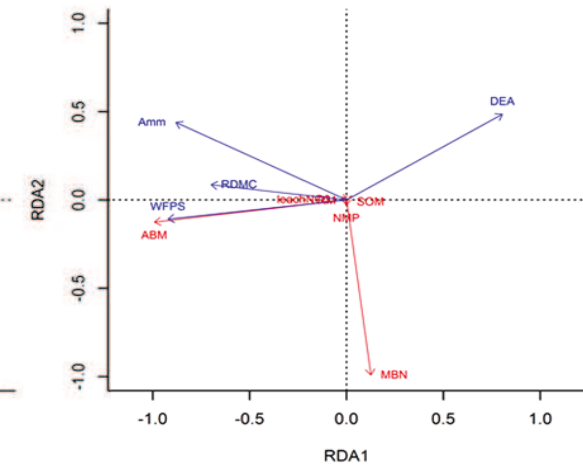
a) Unfertilised mesocosms



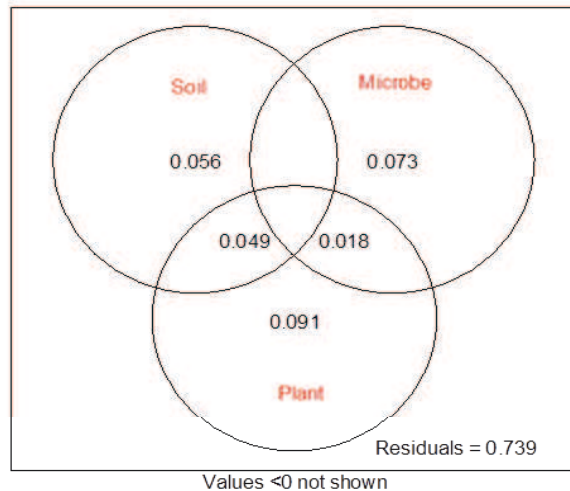
b) Fertilised mesocosms



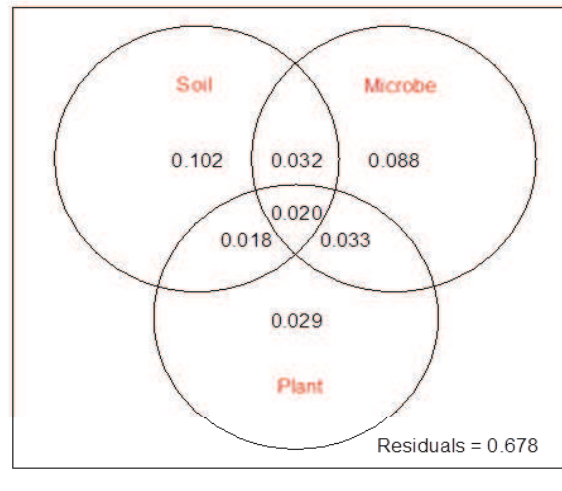
c) All mesocosms



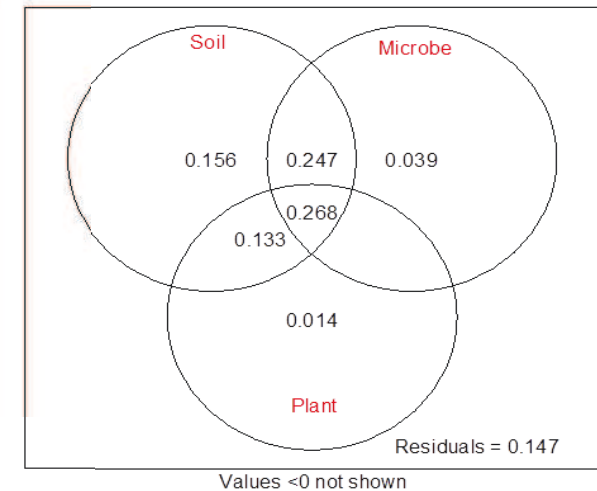
d) Unfertilised mesocosms



e) Fertilised mesocosms



f) All mesocosms



Appendix 7. Percentage variation in the set of selected ecosystem properties provided by the relative contribution of each groups of variables (soil, plants and microbes) and their interactions. The values correspond to the sum of all R^2_{adj} after variation partitioning. Abbreviations : carbon (C), water filled pore space (WFPS), total soil porosity (Porosity), in situ ammonium absorbed in resin (NH_4^+ sorption), in situ nitrate absorbed in resin (NO_3^- sorption), dissolved inorganic nitrogen (DIN), soil ammonium (NH_4^+), soil nitrate (NO_3^-), total soil nitrogen (TotalN), vegetative height (Height), specific root length (SRL), root dry matter content (RDMC), root C:N ratio (Root C:N), root nitrogen concentration (RNC), gene abundance of *Nitrospira* (NIP), fungi to bacteria ratio (F:B ratio), gene abundance of *nirS* (NRS), denitrification enzyme activity (DEA), kinetic parameters of nitrification enzyme activity (V_{max}).

Site	Treatments	% of explaining	p	Explaining variables		
				Soil	Plant	Microbe
Austria	Unfertilized	89.7	***	$\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ ratio; Total C	Height	NIP; F:B ratio
	Fertilized	59.1	*	WFPS	Height	NRS
	All treatments	74.0	***	NH_4^+ sorption; DIN	SRL	AOB
France	Unfertilized	50.3	***	NO_3^- sorption; NO_3^-	Root Diameter	DEA
	Fertilized	49.1	***	Porosity	RDMC; Root C:N	NRS; DEA
	All treatments	59.4	***	NH_4^+ ; WFPS; Total N	RDMC; LNC	NRS; V_{max}
United Kingdom	Unfertilized	32.2	**	WFPS	SRL	F:B ratio
	Fertilized	28.7	**	NH_4^+	RDMC	DEA
	All treatments	86.1	***	NH_4^+ ; WFPS	RDMC; RCC	DEA
All sites	Unfertilized	65.8	***	WFPS; Porosity	Root Diameter; Root C:N	NIP
	Fertilized	62.7	***	Total C	Root Diameter; Root C:N	DEA
	All treatments	63.6	***	Total C	Root Diameter; RNC; Height	NIP; DEA; F:B ratio

Conclusion du chapitre 4

Les traits fonctionnels végétaux se sont révélés être de très bons outils pour comprendre les relations que les individus d'une communauté développent avec leur environnement. Les études en conditions contrôlées (Article 1 & article annexe) ont permis de définir les traits fonctionnels végétaux les plus pertinents pour comprendre les relations entre les propriétés du sol et les communautés végétales et microbiennes. L'expérimentation présentée dans ce chapitre a pour la première fois quantifiée la contribution relative de ces trois composantes (propriétés du sol, traits végétaux et paramètres fonctionnels microbiens) à une gamme de propriétés écosystémiques liées au recyclage de l' N. Bien que ces résultats découlent d'une expérimentation en mésocosme, donc d'écosystèmes simplifiés, elle a permis de déterminer quels traits fonctionnels végétaux, paramètres fonctionnels microbiens ou propriétés du sol sont des marqueurs potentiels du fonctionnement des écosystèmes.

Nous avons montré dans un premier temps que la contribution relative des propriétés du sol, de traits végétaux et des paramètres fonctionnels microbiens était dépendante de la disponibilité en azote (N) de chaque site. En effet, dans les sites les moins fertiles le fonctionnement de l'écosystème était plutôt contrôlé par les microorganismes du sol alors que sur les sites les plus fertiles, il l'était par les communautés végétales. Ce résultat suggère ainsi que les écosystèmes avec un recyclage ralenti de l'N et une forte rétention des nutriments sont contrôlés par les caractéristiques des communautés microbiennes du sol alors que les écosystèmes avec un recyclage important de l'N, notamment pour soutenir une forte production de biomasse, sont contrôlés par les communautés végétales. Ces hypothèses ont été permises par la mise en relation des propriétés des écosystèmes (EP) avec les variables explicatives végétales et microbiennes. En effet, les EPs associées à un recyclage important des nutriments (forte production de biomasse et lessivage) sont liées d'une part avec une concentration plus élevée en nutriments dans le sol, ainsi qu'à des paramètres fonctionnels microbiens liés à la dénitrification (DEA et gène *nirS* élevés), et surtout à des traits fonctionnels végétaux caractéristiques des communautés végétales exploitatrices (diamètre racinaire élevé ; RDMC et rapport C :N faibles). A l'opposé, les EPs associées à une rétention importante des nutriments présentent des relations avec des paramètres microbiens et des traits fonctionnels végétaux opposés (Fig. 1). Cependant, ces résultats représentent une interprétation globale des différents modèles réalisés car excepté pour la biomasse végétale, les relations entre les composantes biotiques et abiotiques et les propriétés du sol ne

montraient pas de patrons assez clairs, nécessitant d'approfondir par la suite avec des analyses des mécanismes impliqués dans ces EPs. Ces analyses sont en cours sous la responsabilité de nos partenaires britanniques du projet VITAL.

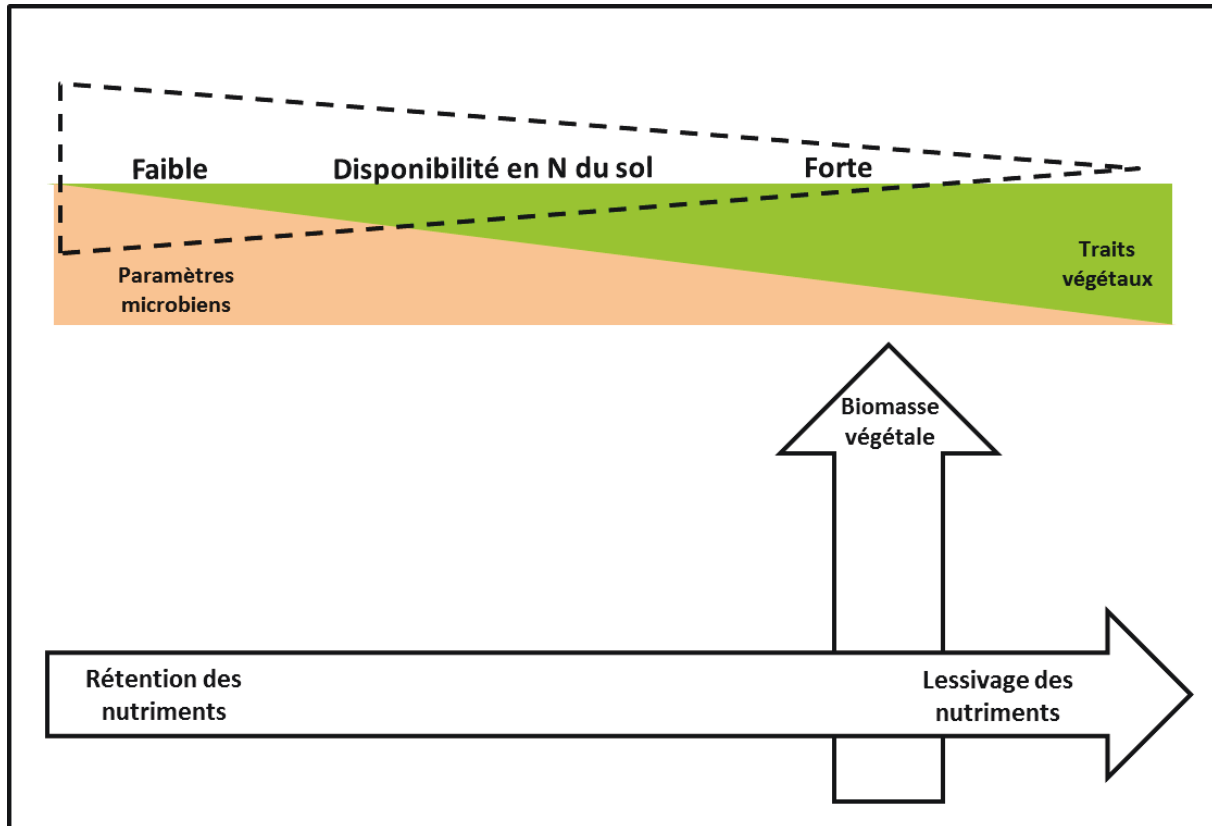


Figure 1 : Présentation de la contribution relative des traits fonctionnels végétaux (en vert) et des paramètres fonctionnels microbiens (orange) aux propriétés des écosystèmes. Le sens de la flèche des propriétés du sol (triangle pointillé) représente à la fois sa contribution directe aux propriétés des écosystèmes et sa contribution indirecte par ses effets sur les traits végétaux et les paramètres microbiens.

Il est cependant utile de noter une conclusion importante concernant les variables explicatives retenues dans les différents modèles, à savoir que les traits fonctionnels racinaires sont les traits végétaux majoritairement retenus dans les modèles. Les variations de ces traits racinaires semblent être couplées avec celles des paramètres fonctionnels microbiens liés à la dénitrification, variations qui contribuent à expliquer les EPs étudiées. Ces résultats confirment ainsi les observations faites dans le chapitre précédent, à savoir que les traits fonctionnels racinaires auraient un rôle prépondérant dans les relations plantes-microorganismes et par suite dans le fonctionnement des écosystèmes.

Chapitre 5

Les traits fonctionnels végétaux comme prédicteurs des propriétés écosystémiques.

Importance du rôle des traits fonctionnels racinaires.

Les différentes études en conditions contrôlées présentées dans les chapitres 3 et 4 ont permis de définir les traits fonctionnels végétaux les plus pertinents pour comprendre les relations entre propriétés du sol, communautés végétales et microbiennes, ainsi que leurs effets sur le fonctionnement des écosystèmes. Nous avons notamment montré au chapitre 4, qu'en mésocosmes la combinaison de ces trois groupes de facteurs était nécessaire pour expliquer les variations du fonctionnement des écosystèmes. Cependant, la contribution de chacun de ces groupes variait en fonction de la fertilité initiale du sol d'un site donné. En conditions naturelles de nombreux autres facteurs abiotiques (texture du sol, pH,...) et biotiques (herbivores aériens et souterrains) vont venir altérer et complexifier ces relations.

Les effets de l'ensemble de ces facteurs ont été pris en compte dans les analyses *in situ* que je présente dans ce chapitre, dans lesquelles les interactions sol-plantes-microorganismes ont été étudiées. A travers la diversité des activités agricoles actuelles et passées du site d'étude, nous avons pu analyser les variations de ces interactions le long d'un gradient de fertilité du sol, de traits fonctionnels végétaux et de paramètres fonctionnels microbiens. L'intérêt d'observations parallèles sur d'autres sites européens prend tout son sens dans ce chapitre puisqu'elles ont permis d'augmenter la taille de notre gradient de traits, de par les variations de climat ou de composition de la roche-mère entre ces sites.

A partir des résultats obtenus sur ces d'observations *in situ*, nous avons dans un premier temps quantifié la contribution relative des traits fonctionnels végétaux et des paramètres fonctionnels microbiens à la fourniture des services de l'écosystème (Grigulis *et al.*, 2013). Dans un second temps, afin d'affiner la compréhension des effets observés par cette analyse globale et les mettre en relation avec les résultats obtenus en conditions contrôlées ou semi-contrôlées, nous avons déterminé l'influence des traits fonctionnels végétaux et des propriétés du sol sur les paramètres fonctionnels microbiens (Legay *et al.*, soumis à Ecology). Les résultats et les conclusions de ces travaux sont présentés sous leur forme publiée ou soumise.

Article 3

SPECIAL FEATURE

PLANT FUNCTIONAL EFFECTS ON ECOSYSTEM SERVICES

Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services

Karl Grigulis^{1*}, Sandra Lavorel², Ute Krainer³, Nicolas Legay², Catherine Baxendale⁴, Maxime Dumont⁵, Eva Kastl⁶, Cindy Arnoldi², Richard D. Bardgett⁴, Franck Poly⁵, Thomas Pommier⁵, Michael Schlöter⁶, Ulrike Tappeiner³, Michael Bahn³ and Jean-Christophe Clément²

¹Station Alpine Joseph Fourier, UMS 3370 CNRS – Université Joseph Fourier, BP 53, 2233 Rue de la Piscine, 38041, Grenoble Cedex 9, France; ²Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR 5553 CNRS – Université Joseph Fourier, BP 53, 2233 Rue de la Piscine, 38041, Grenoble Cedex 9, France; ³Institute of Ecology, University of Innsbruck, Sternwartestrasse 15, A-6020 Innsbruck, Austria; ⁴Soil and Ecosystem Ecology Laboratory, Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK; ⁵Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Université Lyon1, Université de Lyon, USC INRA 1364, UMR CNRS 5557, Villeurbanne Cedex, France; and ⁶Research Unit for Environmental Genomics, Helmholtz Zentrum München, Ingolstädter Landstr. 1, 85764, Neuherberg, Germany

Summary

1. Plant functional diversity and soil microbial community composition are tightly coupled. Changes in these interactions may influence ecosystem functioning. Links between plant functional diversity, soil microbial communities and ecosystem functioning have been demonstrated in experiments using plant monocultures and mixtures, using broad plant and microbial functional groups, but have not been examined in diverse natural plant communities.

2. We quantified the relative effects of plant and microbial functional properties on key ecosystem functions. We measured plant functional diversity, soil microbial community composition and parameters associated with nitrogen (N) cycling and key nutrient cycling processes at three grassland sites in different parts of Europe. Because plant structure and function strongly influence soil microbial communities, we determined relationships between ecosystem properties, plant traits and soil community characteristics following a sequential approach in which plant traits were fitted first, followed by the additional effects of soil micro-organisms.

3. We identified a continuum from standing green biomass and standing litter, linked mostly with plant traits, to potential N mineralization and potential leaching of soil inorganic N, linked mostly with microbial properties. Plant and microbial functional parameters were equally important in explaining % organic matter content in soil. A parallel continuum ran from plant height, linked with above-ground biomass, to plant quality effects captured by the leaf economics spectrum, which were linked with the recycling of carbon (C) and N.

4. More exploitative species (higher specific leaf area, leaf N concentrations and lower leaf dry matter content) and taller swards, along with soil microbial communities dominated by bacteria, with rapid microbial activities, were linked with greater fodder production, but poor C and N retention. Conversely, dominance by conservative species (with opposite traits) and soil microbial communities dominated by fungi, and bacteria with slow activities, were usually linked with low production, but greater soil C storage and N retention.

5. Synthesis – Grassland production, C sequestration and soil N retention are jointly related to plant and microbial functional traits. Managing grasslands for selected, or multiple, ecosystem services will thus require a consideration of the joint effects of plant and soil communities. Further understanding of the mechanisms that link plant and microbial functional traits is essential to achieve this.

*Correspondence author. E-mail: karl.grigulis@ujf-grenoble.fr

Key-words: denitrifying and nitrifying microbial communities, ecosystem service trade-offs, grassland management, long-term ecological research sites, microbial functioning, nitrogen cycling, plant economics spectrum, plant functional diversity, plant–soil (below-ground) interactions, plant–soil microbe interactions

Introduction

The hypothesis that plant traits responding to resource and disturbance gradients, especially those describing plant nutrient economics (sensu Freschet et al. 2010) and size, can be used as predictors of ecosystem functioning (Lavorel & Garnier 2002) has been supported by an increasing number of studies (e.g. Minden & Kleyer 2011; Pakeman 2011; Laliberté & Tylianakis 2012; Lavorel & Grigulis 2012). However, in accordance with theoretical developments on trait–function relationships (Chapin 1993; Reich, Walters & Ellsworth 1997; Garnier & Navas 2012), the majority of quantitative assessments of plant trait effects on ecosystem functioning have focused on above-ground primary productivity and decomposition and do not address how plant traits may influence carbon (C) and nitrogen (N) cycling through their impacts on soil communities (Eviner & Chapin 2003).

Such a 'black box' approach to ecosystem functioning ignores growing evidence that links between plants and soil microbial communities can act as drivers for a wide range of community properties and ecosystem processes (van der Heijden, Bardgett & Straalen 2008; Bardgett & Wardle 2010; Bever et al. 2010). It is now well established that individual plant species (Grayston et al. 1998; Wardle et al. 2003; Harrison & Bardgett 2010), and even different genotypes (Schweitzer et al. 2008; Weinert et al. 2010), can influence the diversity and activity of microbial communities in soil. Such impacts have been attributed to differences in the amount and quality of resources entering the below-ground compartment in the form of litter and root exudates (Bardgett & Wardle 2010). At the plant community level, it is also evident that changes in plant diversity and community structure can have a cascade effect on soil micro-organisms and their functioning, again through altering the amount and quality of resources entering the soil (e.g. Hedlund et al. 2003; De Deyn et al. 2004; Eisenhauer et al. 2010; De Deyn, Quirk & Bardgett 2011a). In turn, this can have consequences for ecosystem services, such as carbon storage and retention of nutrients in soil (e.g. Spehn et al. 2005; Fornara & Tilman 2008; Steinbeiss et al. 2008; De Deyn et al. 2009). However, our understanding of how plant traits influence C and N cycling through their impacts on soil microbial communities remains limited.

To bridge this gap in understanding, an increasing number of studies have sought to quantify the relationship between plant functional traits, soil microbial communities and the functions that they catalyse (De Deyn, Cornelissen & Bardgett 2008; Bardgett & Wardle 2010). For example, studies in temperate grasslands have shown that landscape-scale variation in soil microbial community composition can be explained by certain plant traits, along with other climatic and soil factors (De Vries et al. 2012), and that concomitant variations in leaf

economics traits and the relative abundance of fungi and soil bacteria (F : B ratio) are associated with biomass quality and turnover (Pakeman 2011). Moreover, certain root traits have been shown to be strongly correlated with the F : B ratio, as well as the cycling of C (Klump et al. 2009) and soil nutrients (Orwin et al. 2010). Also, Laughlin (2011) demonstrated that in ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) forest, understory leaf economics traits contributed to explaining nitrification potential through litter quality. Despite this growing understanding, most detailed studies that have explored the way in which plant traits influence below-ground communities, and their effects on C and N cycling, have been performed at an individual plant species or functional group level (e.g. Wardle et al. 1998; Orwin et al. 2010; but see Laughlin 2011). As a result, our understanding of how changes in plant traits impact upon soil microbial communities and ecosystem functioning in natural communities is limited. Moreover, the relative importance of plant traits and soil microbial properties as drivers of ecosystem processes, both above- and below-ground, has not been quantified. Eviner & Chapin (2003) proposed that simple plant traits are likely to be poor predictors of ecosystem functions involving soil processes; this is because of the involvement of soil organisms in these processes, which not only affect biogeochemical cycling directly, but also respond to plant traits (Lavorel et al. 2009). However, this idea has not yet been tested due to the paucity of trait-based studies which have addressed specific below-ground properties relevant to C and nutrient cycling (Garnier et al. 2004; Klump & Soussana 2009; Lavorel et al. 2011; Laliberté & Tylianakis 2012; Lienin & Kleyer 2012).

In this study, we quantified, for the first time in the field, the relative contributions of plant and microbial properties, including measures of the abundance and activity of the microbial community and specific microbial functional groups related to N cycling, to a range of above-ground and below-ground ecosystem processes. We hypothesized that (i) above-ground plant traits have stronger effects on above-ground ecosystem processes in comparison with below-ground ecosystem processes and (ii) nutrient retention is more closely related to certain microbial properties than to plant traits. At each of three grassland sites located in the French and Austrian Alps, and in northern England, each with a range of grassland management systems representative of that area, we quantified (i) plant community composition and functional traits; (ii) soil properties, including microbial community composition and function in relation to N cycling, and (iii) key ecosystem properties related to the C and N cycles, including above-ground biomass, standing litter, soil % organic matter, potential N mineralization (PNM) and potential leaching of inorganic N from soil. We determined the relative effects of plant traits and microbial properties on these ecosystem proper-

ties by analysing, sequentially, direct effects of plant traits and then additional effects of soil micro-organisms.

Materials and methods

STUDY SITES

Grasslands were selected at three long-term research sites in the Austrian Tyrol ('Stubai' henceforth; two grasslands; Schmitt et al. 2010), northern England ('Yorkshire Dales' henceforth; three grasslands; De Deyn et al. 2011b) and the French Alps ('Lautaret' henceforth; three grasslands; Lavorel et al. 2011), which represented a range of climatic, geomorphological and land-use conditions typical of western European temperate mountains. Within each site, individual grasslands (c. 1000 m² each) were representative of current management trends, including abandonment, grazing and/or mowing, with varying levels and frequencies of fertilization (Table 1).

PLANT, SOIL AND ECOSYSTEM PARAMETERS

All plant and soil sampling was carried out in 12 50 9 50 cm quadrats within each grassland when above-ground biomass was at its peak between July and August 2010. Total above-ground biomass and standing litter were estimated in these quadrats using a calibrated visual approach (Lavorel et al. 2008).

Surveys of vegetation composition were performed using the BOTANAL method to estimate species relative biomass (Lavorel et al. 2008). Plant vegetative traits (vegetative height – VH; specific leaf area – SLA; leaf dry matter content – LDMC; leaf C and N concentrations – LCC and LNC), assumed to be relevant to ecosystem processes and the provision of ecosystem services (Quétier, Thébaud & Lavorel 2007; Lavorel et al. 2011), were measured following standard protocols for each of the species that collectively made up 80% of the cumulated biomass (Garnier et al. 2007). For each plant trait, we calculated community-weighted mean (CWM; Garnier et al. 2004) and functional divergence (FD; Mason et al. 2003) using the F-Diversity package (Casanoves et al. 2011).

Subsequently, four upper soil cores per quadrat were sampled down to 5 or 10 cm depth depending on site specificity. These soil cores were pooled to obtain a composite soil sample, which was passed through a 5.6-mm sieve. Subsamples of soil were stored at 4 °C for soil chemical analyses and measurements of enzymatic activities, or at -20 °C until DNA extraction for molecular analysis of microbial communities. A fifth soil core per quadrat was taken to measure bulk density. This core was also used to study potential leaching of soil nitrate (NO₃-N) and ammonium (NH₄^p-N; see next section for details).

ECOSYSTEM PROPERTIES

Peak green biomass, standing litter, microbial biomass N, PNM, soil % organic matter content (SOM) and potential leaching of NQ₃-N and NH₄^p-N, were selected as key ecosystem properties likely to be related to above-ground plant and soil microbial traits.

Above-ground phytomass was sorted to living and dead material, dried (60 °C, 7 days), weighed, ground and analysed for total C and N contents using a Flash EA1112 (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) or a Vario EL III (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany) elemental analyser. Standardized soil methods for long-term ecological research were used to estimate soil-related parameters (Robertson et al. 1999). PNM rates were

Plant traits, microbial properties and ecosystem services

determined using anaerobic incubations of fresh soil subsamples (dark, 7 days, 40 °C), during which organic N was mineralized and accumulated as NH₄^p-N (Waring & Bremner 1964; Wienhold 2007). The difference between NH₄^p contents in a given sample before (t1) and after the anaerobic incubation (t2) gave PNM = [(NH₄^p - N)_{t2} - (NH₄^p - N)_{t1}]/dw/7 days. SOM % was obtained by loss on ignition. Soil microbial biomass N was determined using the chloroform fumigation–extraction procedure (Brookes et al. 1985; Voroney, Winter & Beyaert 1993). Finally, potentially leached NH₄^p-N and NO₃-N were calculated from percolates of the fifth soil core/quadrat leached with a given volume of distilled water (de Vries et al. 2011).

POTENTIAL ENZYMATIC ACTIVITIES OF NITRIFIER AND DENITRIFIER MICRO-ORGANISMS

Potential rates of nitrification were assessed according to Dassonville et al. (2011). Briefly, 3 g dw from each composite fresh soil sample from each quadrat was incubated under aerobic conditions (180 rpm, 28 °C, 10 h) in a solution of (NH₄)₂SO₄ (0, 0.5, 1, 2, 5 and 15 mg N L⁻¹). Rates of NO₂ and NO₃ production were measured after 2 h, 4 h, 8 h and 10 h by ionic chromatography (DX120; Dionex, Salt Lake City, UT, USA). Maximal nitrification rate (V_{max}) and NH₄ affinity (1/K_m) were assessed by plotting nitrification rates along the gradient of NH₄ concentrations (Lineweaver & Burk 1934). Potential denitrification enzyme activity (DEA) was measured according to Attard et al. (2011). Briefly, c. 10 g dw soil was placed at 28 °C under anaerobic conditions using 90 : 10 He : C₂H₂ mixture inhibiting N₂O-reductase activity. Each flask was supplemented with c. 3 mL KNO₃ (50 Ig N-NO₃⁻ g⁻¹ dw), glucose (0.5 mg C g⁻¹ dw) and sodium glutamate (0.5 mg C g⁻¹ dw), completed with distilled water to reach the water-holding capacity. N₂O was measured at 2, 4, 5 and 6 h using a gas chromatograph (microGC RS3000; SRA instruments, Marcy l'Etoile, France).

QUANTIFICATION OF MICROBIAL COMMUNITIES INVOLVED IN NITRIFICATION AND DENITRIFICATION

Soil fungi and bacteria biomasses were determined using phospholipid fatty acid analysis (PLFA) using the extraction, fractionation and quantification of microbial phospholipids (Bardgett, Hobbs & Frostegard 1996). The fatty acids i150 : 0, a150 : 0, 15 : 1, i16 : 0, 17 : 0, i17 : 0, cy17 : 0, cis18 : 1x7 and cy19 : 0 were chosen to represent bacterial fatty acids and 18 : 2x6 to represent fungal fatty acids (Bardgett & McAlister 1999). Finally, the ratio of fungi : bacteria PLFA (F : B) was calculated.

To measure abundance of nitrifiers, ammonia-oxidizing bacteria and archaea were quantified based on the gene copy numbers of the ammonia monooxygenase gene amoA present in soil (amoA-AOB amoA-AOA), and nitrite-oxidizing bacteria were quantified based on the copy numbers of two targeted genes: nrxA of Nitrobacter and 16S rRNA of Nitrospira (Ns). Denitrifying microbes were quantified using the abundance of both types of nitrite reductase genes (nirS and nirK). Soil DNA was extracted from 0.5 g of fresh soil using the FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) and the Precellys24 Instrument (Bertin Technologies, Montigny-le Bretonneux, France). Quantity and quality of extracted DNA were tested by spectrophotometry (Nanodrop; PeqLab, Erlangen, Germany). Quantitative Real-Time PCR was carried out using SYBR green as fluorescent dye. Protocol efficiency, levels of qPCR and inhibition levels of DNA extracts are detailed in Appendix S1 (Supporting information).

Table 1. Study site characteristics

	Austria Stubai Valley		England Wensleydale in the Yorkshire Dales			French Alps Lautaret		
Location	47°7' N, 11°18' E		54°18' N–2°5' W			45.04°N–6.34°E		
Grassland	Meadow	Abandoned grassland	Improved meadow	Semi-improved meadow	Unimproved meadow	Fertilized & mown terrace	Unmown terrace	Unmown meadow
Altitude	1850 m	1970 m	220 m			1700 m		1900 m
Soil/Bed Rock	Dystric Cambisol soils on Granite bedrock		Brown-earth soils over limestone carboniferous limestone bedrock			Brown soils with a sandy-loam texture originating from a mixture of colluviums dominated by calshists with eolian material		
Mean minimum T° of coldest month – mean maximum of the warmest month	-2.4 °C (December–February) to 14.0 °C (July–August)		0 °C (January) to 20 °C (August)			-7.4 °C (February) to 19.5 °C (July)		
Mean annual precipitation	1097 mm		1620 mm			956 mm		
Dominant plant species	Agrostis capillaris, Festuca rubra, Ranunculus montanus, Trifolium pratense, Trifolium repens 2.44% Legumes	Sesleria varia, Erica carnea, Carex sempervirens, Poa alpina, Crocus vernus, Dryas octopetala 1.83% Legumes	Alopecurus pratensis, Poa trivialis, Lolium perenne, Holcus lanatus, Ranunculus acris 0.6% Legumes	Holcus lanatus, Poa trivialis, Lolium perenne, Anthoxanthum odoratum, Filipendula ulmaria, Ranunculus acris 1.6% Legumes	Anthoxanthum odoratum, Agrostis capillaris, Sanguisorba officinalis, Plantago lanceolata 0.8% Legumes	Dactylis glomerata, Trisetum flavescens, Heracleum sphondylium, Gentiana lutea, Agrostis capillaris 14.6% Legumes	Bromus erectus, Sesleria caerulea, Onobrychis montana 14.1% Legumes	Festuca paniculata 0.1% Legumes
Management regime	Cut once a year, grazed in late summer, manured every 2–3 years	Abandoned since 1983	Cut once or twice a year, high-intensity grazing, manured once a year	Cut annually, medium-intensity grazing, manured every 2 years	Cut annually, low-intensity grazing, no fertilizer	Fertilized & mown	Unmown & grazed in spring & autumn	Unmown & summer-grazed – dominated by large perennial grasses

DATA ANALYSES

We used correlative modelling to quantify the respective contributions of plant and microbial traits to variations in measured ecosystem processes. We used linear mixed models with residual maximum likelihood (REML) estimations. Linear mixed models are a powerful class of models that are, in particular, appropriate for the analysis of grouped or clustered data, with grasslands considered as replicates grouped within each of the three experimental sites (Stubai, Lautaret, Yorkshire Dales). The REML algorithm, by associating common random effects with observations within the same group, allows for the specification of the covariance structure induced by the grouping of the data and provides estimations of parameter effects and variance components for both the fixed and random effects in the model. The general structure of our analyses involved each of the ecosystem process response variables (peak green biomass, standing litter, SOM %, potential leached soil $\text{NO}_3\text{-N}$ and $\text{NH}_4\text{-N}$, microbial biomass N, PNM) being modelled as a function of the fixed effect plant trait parameters SLA (CWM and FDvar), vegetative height (CWM and FDvar), LDMC (CWM and FDvar), LNC (CWM and FDvar), LCC (CWM and FDvar), C/N (CWM and FDvar) and microbial properties (V_{max} , $1/K_m$, DEA, F : B ratio, abundances of nirS, nirK, amoA-AOA, amoA-AOB, Ns, nxrA genes and nirK : nirS, AOA : AOB, Ns : nxrA ratios), with site (Stubai, Lautaret, Yorkshire Dales) specified as a random effect. Analyses were carried out using the average information (AI) algorithm to estimate variance parameters within the software package Genstat 11th edition (VSN International, Hemstead, UK). All variables were tested for normality, and log transformations applied as required, prior to analysis.

To provide an objective methodology for the selection of the most parsimonious model (Díaz et al. 2007), analyses were conducted in two steps. First, we determined the effect of each of the plant and microbial trait parameters in isolation on each of the ecosystem processes using a series of single explanatory variable REML linear models. These analyses yielded, for each ecosystem process, a list of those plant and microbial parameters significantly correlated with the ecosystem process, as well as the percentage of variation in the ecosystem process they explained.

Second, to develop multivariable models for each ecosystem process, a hierarchical approach was used in which plant trait parameters were fitted as fixed factors first, with microbial effects being fitted afterwards (following Lavorel et al. 2009). This bottom-up approach to ecosystem functioning was based on the assumption that plant traits have a large influence on microbial traits (Orwin et al. 2010), thus considering residual microbial effects after plant effects have been accounted for. Within the set of plant trait parameters, CWM parameters were fitted first, followed by FDvar parameters following Díaz et al. (2007), assuming that functional variance effects are only of interest beyond those main effects of functional mean effects (with which they are often correlated; Dias et al. 2013). To develop the most explanatory, parsimonious models, for each ecosystem process, only those variables significant from the single variable analyses were used, and these were fitted in the order of the percentage variation in the ecosystem process they explained individually. Each response variable was added to the model in a stepwise manner, with those variables significant in the presence of previously fitted variables being retained in the model and variables no longer significant in the presence of other variables, due to collinearity, being removed from the model. This was especially the case for multiple correlated leaf traits that form the leaf economics spectrum, but which we decided not to select a priori or to combine into a single multivariate proxy in order

to preserve interpretability based on individual traits. We verified the relevance of this approach by running all alternative models for collinear variables with an adjusted R^2 of at least 0.3. Convergence upon a final multiple variable model occurred once all the plant and microbial trait parameters significant individually for a given ecosystem process had been fitted, and either retained or discarded from the model. These final models allowed us to calculate the percentage of variation in the ecosystem process explained by the retained fixed factors, the breakdown of this variation among plant traits and microbial traits, and the effect of each of the retained parameters on the ecosystem process.

Results

Results from the single variable models are presented as Supporting information (Table S2). The stepwise multiple variable model fitting procedure was designed to produce the most biologically meaningful and parsimonious model possible from the wide range of potential explanatory variables, by adding explanatory variables in the order of their perceived biological importance (first CWM plant traits, followed by FDvar plant traits and then microbial variables), and amount of variation explained (Table 2). We acknowledge, however, that in the case of collinearity between variables used in the final model, it is possible that other combinations of explanatory variables could explain similar amounts of variation and that this could have implications for our conclusions. Table S3 presents, for each ecosystem parameter, those explanatory variables not retained in the final models that had significant collinearity (a significant adjusted R^2 of > 0.3) with the variables retained in the final 'best' model (Table 2). Each of the possible alternative multiple variable models stemming from the replacement of the originally retained variables by these collinear ones is then presented. As none of the alternative models tested explained as much variance as the 'best' models retained through the hierarchical stepwise model fitting procedure (Table 2), we now focus on the latter.

The results of the multiple variable REML models revealed a shift in importance from plant to microbial traits along a gradient from vegetation properties, such as peak green biomass and standing litter, to soil processes, such as potential leaching of soil inorganic N ($\text{NO}_3\text{-N}$ or $\text{NH}_4\text{-N}$) and N mineralization potential (Table 2; see also Table S3 for alternative models with collinear variables). The overall amounts of variation explained in the multivariable models by the retained fixed effects (over and above variation in these variables between the sites, removed as a random factor) ranged from 40% to 87%.

Variation in peak green biomass and soil microbial biomass N were overwhelmingly explained by functional properties of the vegetation (95% and 85% of variation explained due to plant traits, respectively; Table 2). Strong positive relationships between peak green biomass and CWM vegetative height (Fig. 1a), and soil microbial biomass N and CWM vegetative height (Table 2), were found at all sites. Both variables were also correlated with CWM SLA, but across the three sites this relationship was positive for peak green bio-

Table 2. Fixed effect plant and microbial trait variables retained within the multivariable REML models for each of the ecosystem properties

Response variable	Retained fixed effects	% Variation explained by fixed effects		Proportion of % variation explained due to plant traits	Proportion of % variation explained due to microbial traits	P	Wald	Standardized effect
Peak green biomass	CWM_height	87	95	5	< 0.001		59.8	0.008
	CWM_SLA				< 0.001		53.4	0.007
	FDvar_height				< 0.001		26.7	-0.185
	Fungi : Bacteria				0.014		7.44	-1.165
Microbial biomass N	CWM_SLA	83	85	15	< 0.001		50.6	-0.020
	CWM_height				< 0.001		21.4	0.032
	FDvar_height				0.004		11.6	0.535
	nirK				0.003		12.7	-0.560
Litter mass	CWM_height	78	83	17	< 0.001		37.17	0.0197
	CWM_SLA				< 0.001		23.35	-0.0333
	K _m				0.002		12.71	-0.2604
Soil organic matter %	CWM_LDMC	83	50	50	< 0.001		40.5	1.024
	CWM_SLA				< 0.001		15.4	-0.020
	DEA				< 0.001		45.1	0.507
Potential N Mineralization	CWM_LDMC	61	18	82	0.008		8.77	1.916
Potential leached NO ₃ -N	DEA				< 0.001		26.2	1.024
Potential leached NO ₃ -N	FDvar_C : N	61	25	75	0.002		16.3	-0.206
Potential leached NH ₄ -N	V _{max}				< 0.001		19.7	0.926
Potential leached NH ₄ -N	CWM_SLA	40	16	84	0.011		7.77	-0.032
Potential leached NH ₄ -N	DEA				0.001		13.7	0.807

CWM, community-weighted mean; DEA, denitrification enzyme activity; FD, functional divergence; LDMC, leaf dry matter content; REML, residual maximum likelihood; SLA, specific leaf area.

Also presented is the % variation in each ecosystem parameter explained by the retained fixed effects (calculated by the reductions in the residual variance due to the addition of the fixed effects to the model after accounting for variation due to the random effect of site), the proportion of explanation afforded by the fixed effects due to plant traits and microbial traits (in *italics*), respectively, and the significance (P), Wald statistic and the direction and magnitude of the standardized effect for each of the retained fixed effects. Results for tests of individual plant and microbial parameters are presented in Table S2.

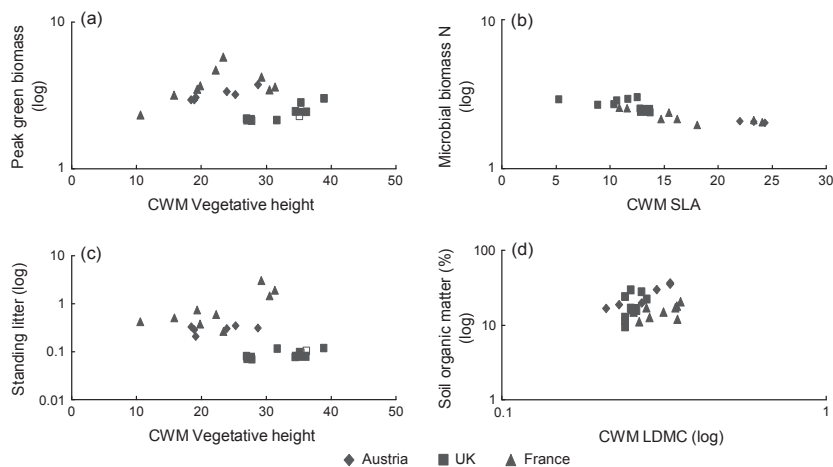


Fig. 1. Selected key plant traits important in controlling (a) peak green biomass, (b) microbial biomass N, (c) standing litter and (d) soil % organic matter content, showing the form of these relationships between the different sites.

mass (Table 2) and negative for soil microbial biomass N (Fig. 1b). In addition, FD in vegetative height had a minor negative effect on peak green biomass, but a minor positive effect on soil microbial biomass N (Table 2). The relationship between peak green biomass or soil microbial biomass N, respectively, with microbial functional parameters (5% and 15% of variation explained, respectively; Table 2) was considerably less than plant trait effects.

Litter mass was mostly explained by plant trait parameters

describing the quantity and quality of plant biomass (83% of variation explained due to plant traits). Across the three sites, litter mass was negatively correlated with CWM SLA and positively correlated with vegetative height (Table 2), although this relationship was not detected at the Stubai site (Fig. 1c). Microbial parameters explained only 17% of variation in litter mass, which was positively correlated the affinity of nitrifiers for ammonia (negative correlation with K_m, the inverse of affinity).

Soil % organic matter content was equally influenced by both plant functional traits and soil microbial communities

(50% of the variance explained each by these groups of parameters; Table 2). The significant plant trait parameters describe the quality of the vegetation being input into the soil, with increasing SOM content being positively correlated with increasing CWM LDMC (Fig. 1d) and decreasing CWM SLA (Table 2). Overall, potential denitrification activity (DEA) was positively related to SOM content, although this relationship did not hold at the French site (Fig. 2a).

Variations in potential inorganic N ($\text{NO}_3\text{-N}$ or $\text{NH}_4\text{-N}$) leaching and PNM were mainly explained by parameters describing N-cycling soil microbial communities (75–84% of variation). Increases in the V_{max} of potential nitrification were strongly linked to increases in potential leaching of $\text{NO}_3\text{-N}$ in soils from the Yorkshire Dales and Lautaret, but not from Stubai (Fig. 2b). Similarly, increases in potential denitrification activities (DEA) were positively correlated with higher N mineralization and increased ammonia leaching potentials at all three sites (Table 2 and Fig. 2c,d). For potential soil $\text{NO}_3\text{-N}$ and $\text{NH}_4\text{-N}$ leaching, a minor effect was also exerted by plant trait parameters linked with the quality of plant biomass. Decreased FD of leaf C : N was positively correlated with potential $\text{NO}_3\text{-N}$ leaching, while CWM SLA was negatively related to $\text{NH}_4\text{-N}$ leaching. Furthermore, plant CWM LDMC showed a positive relationship with PNM (Table 2).

Discussion

ADDITIVE EFFECTS OF PLANT AND MICROBIAL FUNCTIONAL PARAMETERS ON ECOSYSTEM FUNCTIONING

To our knowledge, this is the first study to provide a direct quantification, in the field, of the relative roles of plant traits and microbes in explaining a comprehensive and complementary set of ecosystem properties. Our models, combining plant traits and soil microbial properties, explained high amounts of variance (60–90%) in ecosystem properties (Table 2), demonstrating the value of combining plant functional traits and soil

microbial properties to quantify ecosystem functioning (Wardle et al. 2004; De Deyn, Cornelissen & Bardgett 2008). Because our objective was not to obtain a mechanistic causal model (see, e.g. Laughlin 2011; Laliberté & Tylianakis 2012), nor to incorporate plant–soil feedback (Ehrenfeld, Ravit & Elgersma 2005), our analyses did not explicitly incorporate abiotic effects. However, as abiotic variation occurred largely between sites, the use of site as a random factor accounted for much of the direct effects on ecosystem properties.

Our results are consistent with previous studies which show that leaf and size traits explained 60–80% of variance in ANPP (Garnier et al. 2004; Ansquer et al. 2009; Schumacher & Roscher 2009; Lavorel et al. 2011; Minden & Kleyer 2011; Laliberté & Tylianakis 2012; Lienin & Kleyer 2012). Whilst, overall, 40–50% of variance in leaf litter decomposition was explained by leaf economics traits (meta-analysis by Cornwell et al. 2008; Fortunel et al. 2009; Lienin & Kleyer 2012). Eviner & Chapin (2003) suggested that plant trait effects should be weak for processes involving soil biodiversity. Indeed, Laughlin (2011) found that leaf economics spectrum traits explained only 37% of variation in nitrification potential in *Pinus ponderosa* forest understorey. Here, we demonstrated that the incorporation of soil microbial parameters into models significantly improved our ability to explain below-ground ecosystem processes, typically from < 30% with plant traits alone (Table S1) to 60–80% (Table 2).

Further, by portioning variance in ecosystem properties between plant traits and soil microbial properties associated with N turnover, we identified a continuum of variation from ecosystem properties associated mostly with vegetation traits (> 80% of the explained variance represented by plant traits), such as peak green biomass and standing litter, to ecosystem properties associated mostly with microbial processes, such as soil potential leaching of inorganic N or PNM (> 74% of the explained variance represented by microbial traits). Although we chose a bottom-up approach to quantify direct microbial effects on ecosystem properties beyond those effects already accounted for plant traits, such microbial effects appeared considerable, as suggested by Eviner & Chapin (2003).

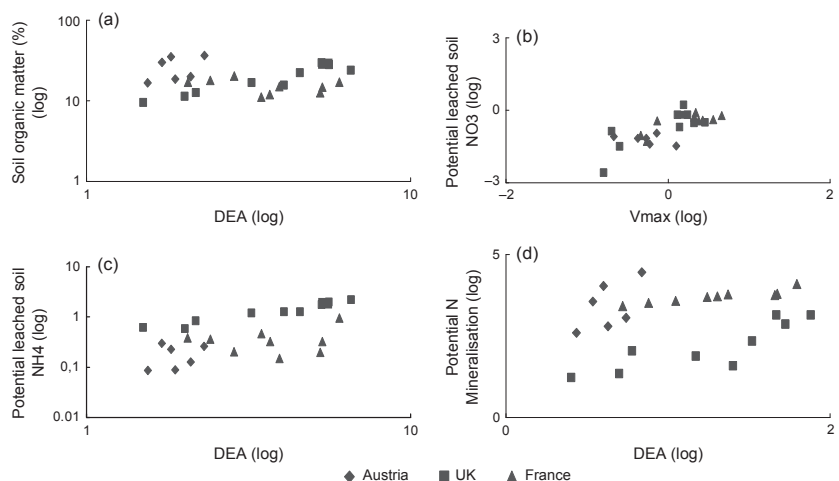


Fig. 2. Selected key microbial traits important in controlling (a) soil % organic matter content, (b) potential leached $\text{NO}_3\text{-N}$, (c) potential leached $\text{NH}_4\text{-N}$ and (d) potential N mineralization, showing the form of these relationships between the different sites.

MECHANISMS UNDERPINNING EFFECTS OF PLANT FUNCTIONAL PARAMETERS ON ECOSYSTEM PROPERTIES

Plant trait effects were overwhelmingly attributed to CWM, supporting the biomass ratio hypothesis and suggesting that traits of the dominant species drive biogeochemical cycling (Grime 1998; Mokany, Ash & Roxburgh 2008; Laughlin 2011; Lavorel et al. 2011). Some non-negligible effects of FD were also retained in the models, though their mechanistic explanation is more tentative. Smaller variance in vegetative height was associated with increased peak biomass, which suggests that plant communities strongly dominated by tall plants were most productive (see Laliberté & Tylianakis 2012). This could feed forward to a greater input of resources and/or diversity of habitats for soil micro-organisms and thus explain the positive relationship between FDvar_height and microbial biomass N. A greater diversity in root architectures and quality (FDvar C : N) may also promote better nitrate uptake and thereby lower potential nitrate leaching.

Parallel to the continuum from plant traits to microbial properties, there was within-plant traits, a continuum from plant quantity, linked more with peak biomass, to plant quality parameters, linked more with the recycling of organic matter (Fig. 3). First, community mean plant height was strongly and positively related to peak green biomass and standing litter, as fast growing, taller species produced more biomass over the season (Ansquer et al. 2009; Lavorel et al. 2011) and thus more litter (Lavorel et al. 2011; Laliberté & Tylianakis 2012; Lavorel & Grigulis 2012). In turn, greater litter inputs to soil, and possibly greater root biomass, might stimulate microbial biomass N by providing more resources for microbes in the rhizosphere (Zak et al. 1994; Paterson 2003; Tscherko et al. 2004).

Secondly, effects on ecosystem processes of leaf economics spectrum traits that reflect the quality of plant material entering the soil (Freschet et al. 2010) were consistent with expectations of nutrient turnover being faster in communities dominated by exploitative species (high SLA and LNC, low LDMC) and, conversely, slower in communities dominated by conservative species (opposite traits; Chapin 1993, 2003; Lavorel & Grigulis 2012). The positive effect of CWM SLA on peak biomass is expected to result from faster growth (Reich, Walters & Ellsworth 1997; Garnier et al. 2004; Pontes Da Silva et al. 2007), while its negative effect on litter mass resulted from poor decomposability of conservative species (Cornwell et al. 2008; Mokany, Ash & Roxburgh 2008; Minden & Kleyer 2011). Indeed, at the Lautaret and Stubi sites, the annual rate of litter decomposition was positively correlated with CWM LNC (data not shown; see also Quétier, Thébaud & Lavorel 2007; Rubatscher 2008). The observed association between more conservative plants and greater soil organic matter content is consistent with both theory (De Deyn, Cornelissen & Bardgett 2008) and evidence from monoculture and mesocosm studies (De Deyn et al. 2009; Orwin et al. 2010).

In contrast to above-ground processes, effects of leaf economics spectrum traits on the soil microbial compartment are

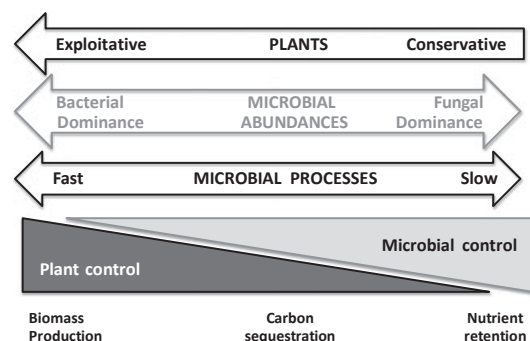


Fig. 3. Schematic overview of simultaneous variations in plant functional strategies, microbial functional composition and activities, and ecosystem processes and services.

poorly understood. The strong negative relationship between CWM SLA and microbial biomass N suggests that the amount of N immobilized by the microbial biomass increases where conservative plants dominate. This finding is broadly consistent with ^{15}N labelling studies which show that soil microbial communities compete more effectively with plants for N in nutrient poor grasslands where conservative species dominate, than in nutrient-rich grasslands dominated by N rich plants, leading to greater microbial immobilization and retention of N in the former (Bardgett, Streeter & Bol 2003; Harrison, Bol & Bardgett 2007; Robson et al. 2010).

Collectively, these results strongly support the relevance of the leaf economics spectrum not only to above-ground biomass and litter decomposition or litter pools, but also to soil processes as expected from theory (De Deyn, Cornelissen & Bardgett 2008) and recent empirical studies (Laughlin 2011; Pakeman 2011; see also Craine et al. 2002). As such, they support the plant economics spectrum hypothesis and its implications for soil processes (Freschet et al. 2010). To complement this systemic view of plant economics, analyses would need to incorporate root traits (Craine et al. 2002; Klumpp et al. 2009; Orwin et al. 2010), even though it has been argued that their effects can be captured through leaf traits (Craine et al. 2001; De Deyn, Cornelissen & Bardgett 2008; Laliberté & Tylianakis 2012).

MECHANISMS UNDERPINNING ASSOCIATIONS OF MICROBIAL PROPERTIES WITH ECOSYSTEM PROPERTIES

As expected, we observed strong links between microbial functional properties and below-ground processes such as potential mineral N leaching, PNM (84% variance explained) and SOM content (50% variance explained). Microbial properties measured under optimal conditions, such as potential denitrification activity (DEA), nitrification affinity ($1/K_m$) and nitrification maximum rate (V_{max}), may be considered as microbial functional traits that directly or indirectly influence ecosystem properties. Our correlative approach should only be interpreted as statistical associations, rather than demon-

strating likely complex, causal links between microbial activities and ecosystem services.

Specifically, we focused on two different functional groups, which catalyse different processes of N turnover: nitrifiers and denitrifiers. Nitrification is a two-step aerobic microbial process fuelled by N mineralization and performed by autotrophic ammonia and nitrite-oxidizing microbes (Schauss et al. 2009). First, lower litter mineralization decreases NH_4^{p} availability and may thus increase plant–microbe competition for available NH_4^{p} (Skiba et al. 2011). As higher standing litter mass results from poor mineralization, this mechanism could explain its positive correlation with nitrifiers' affinity for NH_4^{p} ($1/K_m$). Second, the observed positive effect of nitrification rate (V_{max}) on potential nitrate leaching directly reflects the production by nitrifiers of NO_3^- that is not retained by negatively charged surfaces in soil. In contrast, denitrifiers are heterotrophic facultative anaerobic microbes that reduce NO_3^- to gaseous N forms. They strongly depend on plant-derived C, and their activity is highly influenced by redox conditions in soil and hence by water content or soil texture. As for nitrifiers' affinity for NH_4^{p} , litter mass was also negatively correlated with denitrifying microbes harbouring the nitrite reductase gene *nirS*, confirming previous reports that *nirS*-harbouring bacteria are out-competed by other denitrifiers in habitats with high C availability (Bannert et al. 2011). This strong dependency of denitrifiers on available C sources may also explain the close link of DEA to SOM, which is mainly formed from plant-derived C. Although nitrifiers and denitrifiers exhibit different life histories and occupy different niches in soil (Keil et al. 2011), denitrifiers strongly depend on the activity of nitrifiers. This is because NO_3^- , the substrate for denitrification, is exclusively formed by nitrifiers from NH_4^{p} (Prosser 1989), itself being sourced from N mineralization. Consequently, PNM was positively and indirectly correlated with DEA. Also, when N mineralization is high, NH_4^{p} leaching may occur (Qian & Cai 2007), which may support the positive, but indirect, correlation between DEA and potential NH_4^{p} leaching.

The future investigation of other functionally important microbes, such as arbuscular mycorrhizal fungi and N-fixing microbes, or of microbial communities with reduced functional redundancy, such as those that are involved in the degradation of highly polymeric substances like lignin or other phenolic compounds, may show an even more significant contribution of microbial properties to abiotic soil properties.

A SYNTHETIC FRAMEWORK FOR THE PROVISION OF MULTIPLE ECOSYSTEM SERVICES

Our analyses provide a synthetic hypothesis for the control of the provision of multiple ecosystem services by grasslands (Fig. 3). More exploitative plant strategies (high SLA, high LNC, low LDMC) and taller swards are expected to result in greater fodder production (peak green biomass), but at the cost of poor C and nutrient retention. This is most probably

dominated by procaryotes that perform rapid rates of mineralization and nitrification. Conversely, dominance by plants with conservative strategies (high LDMC and C : N ratio) usually results in low fodder production, but provides benefits for soil C sequestration and nutrient retention, which is potentially linked to the dominance of microbial communities dominated by fungi, co-occurring with procaryotes with slow activities. Because conservative and exploitative plants are likely to impact differently on microbial subgroups, further studies should explore whether changes in microbial activity levels relate to specific groups among nitrifiers/denitrifiers or other microbial functional groups harbouring contrasted activity levels.

Such a framework could have important implications for the management of ecosystem services trade-offs. Our results demonstrate that the effects of plant traits and microbial properties on ecosystem functioning underpin critical trade-offs between production and regulation ecosystem services. Thus, because they are associated with soil microbial communities we suggest that management intensity and associated changes in soil fertility can steer the provision of multiple ecosystem services, through their effects on plant and soil microbial community composition.

Conclusion

This is the first trait-based study, to the best of our knowledge, providing a direct quantification, in the field, of the relative roles of plant and microbial functional traits for a comprehensive set of above- and below-ground ecosystem properties. By demonstrating a continuum from tight coupling with plant traits for above-ground processes to strong linkages with microbial traits for below-ground processes, we confirm the need and refine the scope for the incorporation of soil functional diversity into analyses of biodiversity effects on ecosystem functioning. Although we used a correlative approach, our results highlighted functional markers of ecosystem functioning, including the leaf economics spectrum and a range of soil microbial properties related to nutrient cycling, such as denitrification potential. Such markers need to be tested over a wider range of ecosystems, and their variations with key environmental gradients need to be documented and better understood. In particular, the lack of data and limited understanding of both plant and microbial trait effects on below-ground processes needs to be addressed. Furthermore, in the future, such knowledge should support the management of ecosystem services trade-offs by selecting desired plant and soil functional properties.

Acknowledgements

This study was conducted as part of ERA-Net BiodiverSA project VITAL, ANR-08-BDVA-008. The Lautaret site is part of the long-term research site Zone Atelier Alpes, a member of the ILTER-Europe and LTSER networks. We acknowledge the Joseph Fourier Alpine research station (CNRS UMS 3370) for infrastructure support and Edith Primat, Hanna Secher-Frommell and Marie-Pascale Colace for help with field and laboratory measurements at Lautaret. We thank Nadine Guillaumaud for her help during the field campaign and for the measurements of microbial activities using the Chromatography platform (UMR 5557). Quantitative PCR-targeting nitrite oxidizers were measured using the

platform DTAMB (IFR 41, University Lyon 1). We also thank the handling editor and referee for their considerable input in improving the manuscript.

References

- Ansquer, P., Duru, M., Theau, J.P. & Cruz, P. (2009) Functional traits as indicators of fodder provision over a short time scale in species-rich grasslands. *Annals of Botany*, **103**, 117–126.
- Attard, E., Recous, S., Chabbi, A., De Berranger, C., Guillaumaud, N., Labreuche, J., Philippot, L., Schmid, B. & Le Roux, X. (2011) Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology*, **17**, 1975–1989.
- Bannert, A., Kleineidam, K., Wissing, L., Mueller-Niggemann, C., Vogelsang, V., Welzl, G., Cao, Z. & Schlöter, M. (2011) Changes in diversity and functional gene abundances of microbial communities involved in nitrogen fixation, nitrification, and denitrification in a tidal wetland versus paddy soils cultivated for different time periods. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 6109–6116.
- Bardgett, R.D., Hobbs, P.J. & Frostegard, A. (1996) Changes in the structure of soil microbial communities following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils*, **22**, 261–264.
- Bardgett, R.D. & McAlister, E. (1999) The measurement of soil fungal : bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology and Fertility of Soils*, **29**, 282–290.
- Bardgett, R.D., Streeter, T.C. & Bol, R. (2003) Soil microbes compete effectively with plants for organic-nitrogen inputs to temperate grasslands. *Ecology*, **84**, 1277–1287.
- Bardgett, R.D. & Wardle, D.A. (2010) *Aboveground-Belowground Linkages: Biotic Interactions, Ecosystem Processes, and Global Change*. Oxford University Press, New York, NY, USA.
- Bever, J.D., Dickie, I.A., Facelli, E., Facelli, J.M., Klironomos, J., Moora, M., Rillig, M.C., Stock, W.D., Tibbett, M. & Zobel, M. (2010) Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, **25**, 468–478.
- Brookes, P.C., Kragt, J.F., Powlson, D.S. & Jenkinson, D.S. (1985) Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: the effects of fumigation time and temperature. *Soil Biology & Biochemistry*, **17**, 831–835.
- Casanoves, F., Pla, L., Di Rienzo, J.A. & Diaz, S. (2011) FDiversity: a software package for the integrated analysis of functional diversity. *Methods in Ecology & Evolution*, **2**, 233–237.
- Chapin, F.S., III (1993) Functional role of growth forms in ecosystem and global processes. *Scaling Physiological Processes: Leaf to Globe* (eds J.R. Ehrlinger & C.B. Field), pp. 287–312. Academic press, San Diego.
- Chapin, F.S., III (2003) Effects of plant traits on ecosystem and regional processes: a conceptual framework for predicting the consequences of global change. *Annals of Botany*, **91**, 1–9.
- Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Amatangelo, K., Dorrepaal, E., Eviner, V.T., Godoy, O. et al. (2008) Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. *Ecology Letters*, **11**, 1065–1071.
- Craine, J.M., Froehle, J., Tilman, D.G., Wedin, D.A. & Chapin, F.S., III (2001) The relationships among root and leaf traits of 76 grassland species and relative abundance along fertility and disturbance gradients. *Oikos*, **93**, 274–285.
- Craine, J.M., Tilman, D., Wedin, D., Reich, P.B., Tjoelker, M.G. & Knops, J. (2002) Functional traits, productivity and effects on nitrogen cycling in 33 grassland species. *Functional Ecology*, **16**, 563–574.
- Dassonville, N., Guillaumaud, N., Piola, F., Meerts, P. & Poly, F. (2011) Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions*, **13**, 1115–1133.
- De Deyn, G.B., Cornelissen, J.H.C. & Bardgett, R.D. (2008) Plant functional traits and soil carbon sequestration in contrasting biomes. *Ecology Letters*, **11**, 516–531.
- De Deyn, G.B., Quirk, H. & Bardgett, R.D. (2011a) Plant species richness, identity and productivity differentially influence key groups of microbes in grassland soils of contrasting fertility. *Biology Letters*, **7**, 75–78.
- De Deyn, G.B., Raaijmakers, C.E., Van Ruijven, J., Berendse, F. & Van Der Putten, W.H. (2004) Plant species identity and diversity effects on different trophic levels of nematodes in the soil food web. *Oikos*, **106**, 576–586.
- De Deyn, G.B., Quirk, H., Yi, Z., Oakley, S., Ostle, N.J. & Bardgett, R.D. (2009) Vegetation composition promotes carbon and nitrogen storage in model grassland communities of contrasting soil fertility. *Journal of Ecology*, **97**, 864–875.
- De Deyn, G.B., Shiel, R.S., Ostle, N.J., McNamara, N.P., Oakley, S., Young, I., Freeman, C., Fenner, N., Quirk, H. & Bardgett, R.D. (2011b) Additional carbon sequestration benefits of grassland diversity restoration. *Journal of Applied Ecology*, **48**, 600–608.
- De Vries, F.T., Manning, P., Tallowin, J.R.B., Mortimer, S.R., Pilgrim, E.S., Harrison, K.A., Hobbs, P.J., Quirk, H., Shipley, B., Cornelissen, J.H.C., Kattge, J. & Bardgett, R.D. (2012) Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecology Letters*, **15**, 1230–1239.
- Dias, A.T.C., Berg, M.P., de Bello, F., Van Oosten, A.R., Bila, K. & Moretti, M. (2013) An experimental framework to identify community functional components driving ecosystem processes and services delivery. *Journal of Ecology*, **101**, 29–37.
- Diaz, S., Lavorel, S., De Bello, F., Quétier, F., Grigulis, K. & Robson, T.M. (2007) Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 20684–20689.
- Ehrenfeld, J.G., Ravit, B. & Elgersma, K. (2005) Feedbacks in the plant-soil system. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **30**, 75–115.
- Eisenhauer, N., Beßler, H., Engels, C., Gleixner, G., Habekost, M., Milcu, A. et al. (2010) Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology*, **91**, 485–496.
- Eviner, V.T. & Chapin, F.S., III (2003) Functional matrix: a conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **34**, 455–485.
- Fornara, D.A. & Tilman, D. (2008) Plant functional composition influences rates of soil carbon and nitrogen accumulation. *Journal of Ecology*, **96**, 314–322.
- Fortunel, C., Garnier, E., Joffre, R., Kazakou, E., Quedsted, H., Grigulis, K., et al. (2009) Leaf traits capture the effects of land use changes and climate on litter decomposability of grasslands across Europe. *Ecology*, **90**, 598–611.
- Freschet, G.T., Cornelissen, J.H.C., Van Logtestijn, R.S.P. & Aerts, R. (2010) Evidence of the 'plant economics spectrum' in a subarctic flora. *Journal of Ecology*, **98**, 362–373.
- Garnier, E. & Navas, M.-L. (2012) A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **32**, 365–399.
- Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Debussche, M., Laurent, G., Blanchard, A., Aubry, D., Bellmann, A., Neill, C. & Toussaint, J.-P. (2004) Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology*, **85**, 2630–2637.
- Garnier, E., Lavorel, S., Ansquer, P., Castro, H., Cruz, P., Dolezal, J. et al. (2007) Assessing the effects of land-use change on plant traits, communities and ecosystem functioning in grasslands: a standardized methodology and lessons from an application to 11 European sites. *Annals of Botany*, **99**, 967–985.
- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D. & Edwards, A.C. (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**, 369–378.
- Grime, J.P. (1998) Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal of Ecology*, **86**, 902–906.
- Harrison, K.A. & Bardgett, R.D. (2010) Influence of plant species and soil conditions on plant-soil feedback in mixed grassland communities. *Journal of Ecology*, **98**, 384–395.
- Harrison, K.A., Bol, R. & Bardgett, R.D. (2007) Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. *Ecology*, **88**, 989–999.
- Hedlund, K., Santa Regina, I., Van der Putten, W.H., Lepš, J., Díaz, T., Korthals, G.W. et al. (2003) Plant species diversity, plant biomass and responses of the soil community on abandoned land across Europe: idiosyncrasy or above-belowground time lags. *Oikos*, **103**, 45–58.
- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. & Straalen, N.M.V. (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, **11**, 296–310.
- Keil, D., Meyer, A., Berner, D., Poll, C., Schützenmeister, A., Piepho, H.P., Vlasenko, A., Philippot, L., Schlöter, M., Kandeler, E. & Marhan, S. (2011) Influence of land-use intensity on the spatial distribution of N-cycling microorganisms in grassland soils. *FEMS Microbiology Ecology*, **77**, 95–106.
- Klump, K. & Soussana, J.F. (2009) Using functional traits to predict grassland ecosystem change: a mathematical test of the response-and-effect trait approach. *Global Change Biology*, **15**, 2921–2934.
- Klump, K., Fontaine, S., Attard, E., Le Roux, X., Gleixner, G. & Soussana, J.-F. (2009) Grazing triggers soil carbon loss by altering plant roots and their control on soil microbial community. *Journal of Ecology*, **97**, 876–885.
- Laliberté, E. & Tylianakis, J.M. (2012) Cascading effects of long-term land-use changes on plant traits and ecosystem functioning. *Ecology*, **93**, 145–155.

- Laughlin, D.C. (2011) Nitrification is linked to dominant leaf traits rather than functional diversity. *Journal of Ecology*, **99**, 1091–1099.
- Lavelle, S. & Garnier, E. (2002) Predicting the effects of environmental changes on plant community composition and ecosystem functioning: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology*, **16**, 545–556.
- Lavelle, S. & Grigulis, K. (2012) How fundamental plant functional trait relationships scale-up to trade-offs and synergies in ecosystem services. *Journal of Ecology*, **100**, 128–140.
- Lavelle, S., Grigulis, K., McIntyre, S., Williams, N.S.G., Garden, D., Dorrough, J., Berman, S., Quétier, F., Thebault, A. & Bonis, A. (2008) Assessing functional diversity in the field – methodology matters! *Functional Ecology*, **22**, 134–147.
- Lavelle, S., Harrington, R., Storkey, J., Díaz, S., Bello, F.D., Bardgett, R.D. et al. (2009) RUBICODE Report – How Trait Linkages within and Across Trophic Levels Underlie the Vulnerability of Ecosystem Services. FP6, Thematic Area: Global Change and Ecosystems. European Commission, DG Research, Brussels.
- Lavelle, S., Grigulis, K., Lamarque, P., Colace, M.-P., Garden, D., Girel, J., Douzet, R. & Pellet, G. (2011) Using plant functional traits to understand the landscape-scale distribution of multiple ecosystem services. *Journal of Ecology*, **99**, 135–147.
- Lienin, P. & Kleyer, M. (2012) Plant trait responses to the environment and effects on ecosystem properties. *Basic and Applied Ecology*, **13**, 301–311.
- Lineweaver, H. & Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, **56**, 658–666.
- Mason, N.W.H., MacGillivray, K., Steel, J.B. & Wilson, J.B. (2003) An index of functional diversity. *Journal of Vegetation Science*, **14**, 571–578.
- Minden, V. & Kleyer, M. (2011) Testing the effect–response framework: key response and effect traits determining above-ground biomass of salt marshes. *Journal of Vegetation Science*, **22**, 387–401.
- Mokany, K., Ash, J. & Roxburgh, S. (2008) Functional identity is more important than diversity in influencing ecosystem processes in a temperate native grassland. *Journal of Ecology*, **96**, 884–893.
- Orvin, K.H., Buckland, S.M., Johnson, D., Turner, B.L., Smart, S., Oakley, S. & Bardgett, R.D. (2010) Linkages of plant traits to soil properties and the functioning of temperate grassland. *Journal of Ecology*, **98**, 1074–1083.
- Pakeman, R.J. (2011) Multivariate identification of plant functional response and effect traits in an agricultural landscape. *Ecology*, **92**, 1353–1365.
- Paterson, E. (2003) Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. *European Journal of Soil Science*, **54**, 741–750.
- Pontes Da Silva, L., Soussana, J.F., Louault, F., Andueza, D. & Carrère, P. (2007) Leaf traits affect the above-ground productivity and quality of grasses. *Functional Ecology*, **21**, 844–853.
- Prosser, J.I. (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, **30**, 125–181.
- Qian, C. & Cai, Z. (2007) Leaching of nitrogen from subtropical soils as affected by nitrification potential and base cations. *Plant and Soil*, **3**, 197–205.
- Quétier, F., Thébault, A. & Lavelle, S. (2007) Linking vegetation and ecosystem response to complex past and present land use changes using plant traits and a multiple stable state framework. *Ecological Monographs*, **77**, 33–52.
- Reich, P.B., Walters, M.B. & Ellsworth, D.S. (1997) From tropics to tundra: a global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**, 13730–13734.
- Robertson, G.P., Coleman, D.C., Bledsoe, C.S. & Sollins, P. (1999) *Standard Soil Methods for Long-term Ecological Research*. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Robson, T.M., Baptist, F., Clément, J.C. & Lavelle, S. (2010) Land use in sub-alpine grasslands affects N cycling via changes in plant community and soil microbial uptake dynamics. *Journal of Ecology*, **98**, 62–73.
- Rubatscher, D. (2008) *Carbon Pools and Their Dynamics in Mountain Ecosystems Differing in Land Use*. PhD, Innsbruck University, Innsbruck.
- Schauss, K., Focks, A., Leininger, S., Kotzerke, A., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S. et al. (2009) Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. *Environmental Microbiology*, **11**, 446–456.
- Schmitt, M., Bahn, M., Wohlfahrt, G., Tappeiner, U. & Cernusca, A. (2010) Land use affects the net ecosystem CO₂ exchange and its components in mountain grasslands. *Biogeosciences*, **7**, 2297–2309.
- Schumacher, J. & Roscher, C. (2009) Differential effects of functional traits on aboveground biomass in semi-natural grasslands. *Oikos*, **118**, 1659–1668.
- Schweitzer, J.A., Bailey, J.K., Fischer, D.J., LeRoy, C.J., Lonsdorf, E.V., Whitham, T.G. & Hart, S.C. (2008) Soil microorganism-plant interactions: a heritable relationship between plant genotype and associated soil microorganisms. *Ecology*, **89**, 773–781.
- Skiba, M.W., George, T.S., Baggs, E.M. & Daniell, T.J. (2011) Plant influence on nitrification. *Biochemical Society Transactions*, **39**, 275–278.
- Spehn, E.M., Hector, A., Joshi, J., Scherer-Lorenzen, M., Schmid, B., Bazeley-White, E. et al. (2005) Ecosystem effects of biodiversity manipulations in European grasslands. *Ecological Monographs*, **75**, 37–63.
- Steinbeiss, S., Beßler, H., Engels, C., Temperton, V.M., Buchmann, N., Roscher, C., Kreuziger, Y., Baade, J., Habekost, M. & Gleixner, G. (2008) Plant diversity positively affects short-term soil carbon storage in experimental grasslands. *Global Change Biology*, **14**, 2937–2949.
- Tscherko, D., Hammesfahr, U., Marx, M.C. & Kandeler, E. (2004) Shifts in rhizosphere microbial communities and enzyme activity of *Poa alpina* across an alpine chronosequence. *Soil Biology and Biochemistry*, **36**, 1685–1698.
- Voroney, R., Winter, J. & Beyaert, R. (1993) *Soil microbial biomass C and N. Soil Sampling and Methods of Analysis* (ed. M.R. Carter), pp. 277–286. Canadian Society of Soil Science, Lewis, Chelsea.
- de Vries, F.T., van Groenigen, J.W., Hoffland, E. & Bloem, J. (2011) Nitrogen losses from two grassland soils with different fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 997–1005.
- Wardle, D.A., Barker, G.M., Bonner, K.I. & Nicholson, K.S. (1998) Can comparative approaches based on plant ecophysiological traits predict the nature of biotic interactions and individual plant species effects in ecosystems? *Journal of Ecology*, **86**, 405–420.
- Wardle, D.A., Yeates, G.W., Williamson, W. & Bonner, K.I. (2003) The response of a three trophic level soil food web to the identity and diversity of plant species and functional groups. *Oikos*, **102**, 45–56.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., Van der Putten, W. H. & Wall, D.H. (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, **304**, 1629–1633.
- Waring, S.A. & Bremner, J.M. (1964) Ammonium production in soil under waterlogged conditions as an index of nitrogen availability. *Nature*, **201**, 951–952.
- Weinert, N., Meincke, R., Gottwald, C., Heuer, H., Schlöter, M., Berg, G. & Smalla, K. (2010) Bacterial diversity on the surface of potato tubers in soil and the influence of the plant genotype. *FEMS Microbiology Ecology*, **74**, 114–123.
- Wienhold, B.J. (2007) Comparison of laboratory methods and an in situ method for estimating nitrogen mineralization in an irrigated silt-loam soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **38**, 1721–1732.
- Zak, D.R., Tilman, D., Parmenter, R.R., Rice, C.W., Fisher, F.M., Vose, J., Milchunas, D. & Martin, C.W. (1994) Plant production and soil microorganisms in late-successional ecosystems: a continental-scale study. *Ecology*, **75**, 2333–2347.

Received 2 April 2012; accepted 5 October 2012

Handling Editor: Michael Hutchings

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Quantitative PCR conditions used to estimate abundances of N-related microbial functional groups.

Table S2. Results of REML tests of individual plant and microbial parameters as explanatory factors for each ecosystem parameter.

Table S3. Alternative multivariable REML models for each of the ecosystem properties resulting from the replacement of plant and microbial traits retained in the original final models (Table 2) by alternatively significant collinear traits with an adjusted R of >0.3.

Appendix S1. Detailed experimental protocol for the quantification of the abundance of nitrifiers, ammonia-oxidizing bacteria and archaea.

Supplementary Material

Appendix 1 – Detailed experimental protocol for the quantification of the abundance of nitrifiers, ammonia-oxidizing bacteria and archaea

The composition of each reaction mix is given in Table S1. For all genes dilution series of the DNA extracts were previously tested to avoid inhibition of PCR, resulting in an optimal dilution of 1:64 for all samples with 2 µl as template. Forty and ten ng of soil DNA extract were used as templates (5µl) for *nxrA* and *16S rRNA* Nitrospira (Ns) respectively, and samples were run at least twice. For these genes, the presence of PCR inhibitors in DNA extracts was checked by co-amplification of standards with randomly chosen soil DNA samples; no inhibition was observed. Serial plasmid dilutions of the respective functional genes ranging from 10^1 to 10^7 gene copies/µL were used as standards. PCR runs with an initial step for enzyme activation at 95 °C for either 10 min (*nirK*, *nirS*, *amoA* (AOA), *amoB* (AOB)) or 15 min (Ns, *nxrA*). To confirm the amplicons specificity after each PCR run, a melting curve and a 2 % agarose gel stained with ethidium bromide were done to validate the amplified fragment length. The efficiencies (Eff) of the amplification were calculated from the standard curve with the formula $\text{Eff} = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] * 100 \%$ and resulted in the following values: *amoA* -AOB (AOB) 93-95 %, *amoA*-AOA 91–98 %, *nirS* 99–100 %, *nirK* 94–99 %, *nxrA* 91-94%, Ns 83-94%.

Table S1 – Quantitative PCR conditions used to estimate abundances of N-related microbial functional groups (Ammonium oxidizers, Nitrite oxidizers and Nitrite reducers)

Target gene	Master Mix	Thermal profile	No. of cycles	Reactional volume*	Primer	Primer* (10 µM)	DMSO*	BSA*	Source of standard	Devices	References
amoA AOA	Power SybrGreen (Applied Biosystems)	94°C–45 s/55°C–45s/72°C–45 s	40	25	amo19F, CrenamoA16r48x	0.5	-	0.5	Fosmid clone 54d9	7300 (Applied Biosystems, Germany)	Treusch et al. 2005
	Power SybrGreen (Applied Biosystems)	94°C–60 s/58°C–60s/72°C–60 s	40	25	amoA1F, amoA2R	0.5	-	0.5	<i>Nitrosomonas</i> sp.	7300 (Applied Biosystems, Germany)	Leininger et al. 2006 Rotthauwe et al. 1997
nirS	Power SybrGreen (Applied Biosystems)	94°C–45 s/57°C–45s/72°C–45 s	40	25	cd3aF, R3cd	0.5	0.625	0.5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	7300 (Applied Biosystems, Germany)	Throback et al. 2004
nirK	Power SybrGreen (Applied Biosystems)	95°C–15 s/63°C–30s/72°C–30 s	5a	25	nirK876, nirK5R	0.5	0.625	0.5	<i>Azospirillum irakense</i>	7300 (Applied Biosystems, Germany)	Braker et al. 1998
		95°C–15 s/58°C–30s/72°C–30 s	40								
16S rRNA	QuantiTect SybrGreen PCR Master (Qiagen)	95°C-30 s/64°C-30s/72°C- 60s	40	25	Ns675f, Ns746r	1	-	-	Clone accession number FJ529918	LC 480 (Roche Diagnostics, France)	Graham et al. 2007
Nitrospira	QuantiTect SybrGreen PCR Master (Qiagen)	95°C-30s/55°C-45s/72°C-45s	45	20	F1norA, R2norA	1	-	-	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	LC 480 (Roche Diagnostics, France)	Attard et al. 2010

a=touchdown PCR

*volumes in µl

References

- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H-P., Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amorelated proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol*, **7**, 1985–1995
- Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, **442**, 806–809
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 4704–4712
- Throback, I.N., Enwall, K., Jarvis, A., Hallin, S. (2004) Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol*, **49**, 401–417
- Braker, G., Fesefeldt, A., Witzel, K.P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 3769–3775
- Attard, E., Poly, F., Commeaux, C., Laurent, F., Terada, A., Smets, B.F., Recous, S. & Roux, X.L. (2010) Shifts between Nitrospira- and Nitrobacter-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. *Environmental Microbiology*, **12**, 315–326.
- Graham, D.W., Knapp, C.W., Van Vleck, E.S., Bloor, K., Lane, T.B. & Graham, C.E. (2007) Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *ISME Journal*, **1**, 385–393.

Table S2 –Results of REML tests of individual plant and microbial parameters as explanatory factors for each ecosystem parameter. Presented are the P values, the amount of variation explained by each plant or microbial parameter and its standardised effect

	Peak green biomass t/ha			Total Microbial Biomass N			Standing Litter t/ha			Soil organic matter (%)			Potential leached NO3-N (µg g-1 soil)			Mineralisation (NH4-N µg g-1 d-1)			Potential leached NH4-N (µg g-1 soil)		
	p	% variance	std. effect	p	% variance	std. effect	p	% variance	std. effect	p	% variance	std. effect	p	% variance	std. effect	p	% variance	std. effect	p	% variance	std. effect
Plant Traits																					
CWM SLA (mm ² mg-1dry)	0,032	12,96	0,01	<0,001	40,76	-0,04	0,001	38,77	-0,04	0,011	28,08	-0,02	ns			ns			0,043	6,33	-0,03
CWM Height (cm)	0,004	33,12	0,01	0,001	39,64	0,03	0,001	39,54	0,03	ns			ns			ns			ns		
Fdvar SLA (mm ² g-1dry)	ns			ns			ns			ns			0,007	29,88	-2,31	ns			ns		
Fdvar Height (cm)	0,005	32,00	-0,22	0,003	40,31	0,63	0,007	18,43	0,65	ns	15,76	0,27	ns			0,04	0,03	0,56	ns		
CWM LNC (mg g-1)	<0,001	44,32	0,01	ns			ns			ns			ns			ns			ns		
CWM LCC (mg g-1)	ns			ns			0,002	35,12	12,47	0,006	14,78	6,81	ns			ns			ns		
CWM C/N	<0,001	54,24	-0,01	ns			ns			ns			ns			ns			ns		
Fdvar LNC	ns			0,010	29,18	-0,28	0,002	35,70	-0,34	ns			ns			ns			ns		
Fdvar LCC	ns			ns			ns			0,032	17,24	-0,19	ns			ns			ns		
Fdvar C/N	ns			ns			ns			ns			0,029	15,38	-0,37	ns			ns		
CWM LDMC	ns			ns			ns			0,006	30,54	1,40	ns			0,04	0,11	2,04	ns		
Fdvar LDMC	ns			ns			ns			ns	13,30	-0,13	ns			ns			ns		
Microbial Traits																					
<i>nirS</i>	ns			ns			<0,001	47,79	-0,52	ns			ns			0,03	20,39	0,36	ns		
<i>nirK</i>	ns			0,053	17,59	0,45	0,019	21,88	0,50	0,003	32,57	0,28	0,02	-16,27	-0,90	ns			ns		
<i>amoA</i> (AOA)	ns			ns			0,017	23,99	-0,20	ns			0,013	27,81	0,47	0,07	6,80	0,17	ns		
<i>amoB</i> (AOB)	ns			ns			ns			ns			0,003	31,95	0,82	0,06	9,67	0,26	ns		
AOA:AOB ratio	ns			ns			0,003	34,36	-0,30	ns			ns			ns			ns		
<i>nirK:nirS</i> ratio	ns			0,037	21,60	0,21	<0,001	52,40	0,36	ns			ns			ns			ns		
Vmax (µg N-NH4+ g-1.h-1)	ns			ns			ns			ns			<0,001	45,56	1,12	0,03	16,92	0,30	ns		
Km (µg N-NH4+ l-1)	ns			ns			0,028	15,16	-0,33	ns			ns			ns			ns		
DEA (µg N-N2O.g-1.h-1)	ns			ns			ns			0,014	26,11	0,41	<0,001	32,25	2,00	<0,001	46,22	1,01	0,008	24,18	0,73
<i>Ns</i>	ns			ns			0,023	17,08	-0,23	ns			<0,001	54,14	0,88	ns			ns		
<i>nxrA</i>	ns			ns			ns			ns			0,01	23,67	0,63	ns			ns		
<i>Ns : nxrA</i>	ns			ns			0,018	20,15	-0,32	ns			ns			ns			ns		
Fungi : Bacteria ratio	0,024	22,88	-2,03	<0,001	67,30	-7,16	ns			0,016	26,11	-3,74	ns			ns			ns		

Table S3 - Alternative multivariable REML models for each of the ecosystem properties resulting from the replacement of plant and microbial traits retained in the original final models (Table 2) by alternatively significant collinear traits with an adjusted R² of greater than 0.3. Co-linearity of explanatory variables was tested using pair wise REML's between all of the individually significant variables (Table S2) using site as a random factor. The stepwise model fitting and optimisation procedure for the multiple variable models was the same as described in the methods for the original models, apart from the replacement of each the originally chosen variables, in turn by each of the significantly co-linear variables.

1) Peak Green Biomass (Best original final model % variation explained by fixed effects = 87.33 (94.54% plant traits / 5.46% microbial traits))

Parameters retained in best final model	Significant co-linearities with other individually significant variables dropped from final model.			Most parsimonious alternative multiple variable REML models fitting co-linear variables in place of original best final model parameters					
		p value	Adjusted R ²		p value	Wald	% variation explained by fixed effects	proportion of % variation explained due to plant traits	proportion of % variation explained due to microbial traits
CWM_Height	CWM C :N	<0.001	0.37	CWM C :N	<0.001	44.22	74.72	87	13
				FDvar_Height	0.003	11.67			
				Fungi : Bacteria	0.012	7.72			
CWM_SLA	None								
FDvar_Height	None								
Fungi : Bacteria	None								

2) Microbial biomass N (Best original final model % variation explained by fixed effects = 83.27 (85.32% plant traits / 14.68% microbial traits))

Parameters retained in best final model	Significant co-linearities with other individually significant variables dropped from final model.			Most parsimonious alternative multiple variable models fitting co-linear variables in place of original final model parameters					
		p value	Adjusted R ²		p value	Wald	% variation explained by fixed effects	proportion of % variation explained due to plant traits	proportion of % variation explained due to microbial traits
CWM_SLA	<i>nirK : nirS</i> ^a	0.006	0.31	CWM_Height	<0.001	28.07	71.49	100	0
				FDvar_Height	<0.001	18.78			
CWM_Height	<i>nirK : nirS</i> ^b	<0.001	0.38	CWM_SLA	<0.001	24.09	40.75	100	0
	FDvar_LNC ^c	<0.001	0.41	CWM_SLA	<0.001	24.09	40.75	100	0
FDvar_Height	None								
nirK	<i>nirK : nirS</i>	<0.001	0.56	CWM_SLA	<0.001	52.51	79.31	90	10
				CWM_Height	<0.001	18.22			
				FDvar_Height	0.04	5.05			
				<i>nirK : nirS</i>	0.005	12.47			
	FDvar_LNC ^d	<0.001	0.48	CWM_SLA	<0.001	29.84	71.05	100	0
				CWM_Height	0.003	12.41			
				FDvar_Height	0.022	6.38			

^a *nirK : nirS* not significant in multivariate model including CWM_Height and FDvar-Height

^b *nirK : nirS* not significant in multivariate model including CWM_SLA

^c FDvarLNC not significant in multivariate model including CWM_SLA

^d FDvarLNC not significant in multivariate model including CWM_SLA, CWM_Height and FDvar_Height

3) Litter mass (Best original final model % variation explained by fixed effects = 77.74 (82.96% plant traits / 17.04% microbial traits))

Parameters retained in best final model	Significant co-linearities with other individually significant variables dropped from final model.			Most parsimonious alternative multiple variable models fitting co-linear variables in place of original final model parameters					
		p value	Adjusted R ²		p value	Wald	% variation explained by fixed effects	proportion of % variation explained due to plant traits	proportion of % variation explained due to microbial traits
CWM_Height	<i>nirK</i> : <i>nirS</i>	0.002	0.37	<i>nirK</i> : <i>nirS</i>	<0.001	24.5	52.40	0	100
	<i>nirS</i>	0.008	0.29	<i>nirS</i>	<0.001	20	62.18	62	38
				CWM_SLA	0.012	20.3			
	FDvar_LNC ^a	<0.001	0.42	CWM_SLA	<0.001	18.23	54.70	71	29
				Km	0.008	8.69			
CWM_SLA	<i>nirK</i> : <i>nirS</i>	0.006	0.31	CWM_Height	<0.001	18.92	56.04	71	29
				<i>nirK</i> : <i>nirS</i>	0.005	9.77			
	<i>nirK</i> ^b	0.004	0.33	CWM_Height	<0.001	17.07	50.86	78	22
				Km	0.022	6.2			
	CWM_LCC	0.007	0.30	CWM_Height	<0.001	20.39	58.73	88	12
				CWM_LCC	0.014	7.42			
				Km	0.046	4.59			
	FDvar_Height	0.002	0.36	CWM_Height	<0.001	17.92	53.93	100	0
				FDvar_Height	0.008	8.8			
Km	Ns	<0.001	0.42	CWM_Height	<0.001	35.67	75.62	85	15
				CWM_SLA	<0.001	21.25			
				Ns	0.005	9.95			

^a FDvar_LNC not significant in multivariable model including CWM_SLA and Km

^b *nirK* not significant in multivariate model including CWM_Height and Km

4) Soil organic matter % (Best original final model % variation explained by fixed effects = 82.61 (50.09% plant traits / 49.91% microbial traits))

Parameters retained in best final model	Significant co-linearities with other individually significant variables dropped from final model.			Most parsimonious alternative multiple variable models fitting co-linear variables in place of original final model parameters					
		p value	Adjusted R ²		p value	Wald	% variation explained by fixed effects	proportion of % variation explained due to plant traits	proportion of % variation explained due to microbial traits
CWM_LDMC	CWM_LCC	<0.001	0.77	CWM_LCC	<0.001	21.03	82.02	35	65
				CWM_SL A	<0.001	16.67			
				DEA	<0.001	59.59			
	FDvar_LCC	<0.001	0.46	FDvar_LCC	<0.001	25.34	82.36	53	47
				CWM_SL A	<0.001	32.61			
				DEA	<0.001	41.25			
	<i>nirK</i>	0.002	0.37	<i>nirK</i>	0.002	13.24	71.77	39	61
				CWM_SL A	0.004	10.37			
				DEA	<0.001	31.25			
CWM_SL A	<i>nirK</i> ^a	0.004	0.33	CWM_LDMC	<0.001	17.81	61.08	50	50
				DEA	<0.001	15.72			
	CWM_LCC ^b	0.007	0.30	CWM_LDMC	<0.001	17.81	61.08	50	50
				DEA	<0.001	15.72			
DEA	None								

^a *nirK* not significant in multiple variable model with CWM_LDMC and DEA

^b CWM_LCC not significant in multiple variable model with CWM_LDMC and DEA

5) Potential N Mineralisation (Best original final model % variation explained by fixed effects = 61.18 (17.53% plant traits / 82.47% microbial traits))

Parameters retained in best final model	Significant co-linearities with other individually significant variables dropped from final model.			Most parsimonious alternative multiple variable models fitting co-linear variables in place of original final model parameters					
		p value	Adjusted R ²		p value	Wald	% variation explained by fixed effects	proportion of % variation explained due to plant traits	proportion of % variation explained due to microbial traits
CWM_LDMC	None								
DEA	Vmax	<0.001	0.70	CWM_LDMC	0.02	6.32	37.46	29	71
				Vmax	0.005	9.71			
	<i>nirS</i>	0.004	0.31	CWM_LDMC	0.03	5.51	36.40	29	71
				<i>nirS</i>	0.01	8.06			

6) Potential leached NO₃-N (Best original final model % variation explained by fixed effects = 60.95 (25.24% plant traits / 74.76% microbial traits))

Parameters retained in best final model	Significant co-linearities with other individually significant variables dropped from final model.			Most parsimonious alternative multiple variable models fitting co-linear variables in place of original final model parameters					
		p value	Adjusted R ²		p value	Wald	% variation explained by fixed effects	proportion of % variation explained due to plant traits	proportion of % variation explained due to microbial traits
FDvar_C : N	None								
Vmax	<i>amoA</i> (AOA)	<0.001	0.71	<i>amoA</i> (AOA)	0.013	9.27	27.81	0	100
	DEA	<0.001	0.70	DEA	<0.001	17.34	33.72	0	100
	Ns	<0.001	0.93	FDvar_C : N	0.005	10.00	55.32	28	72
				Ns	<0.001	20.63			
	<i>nxrA</i> ^a	<0.001	0.47	FDvar_C : N	0.029	11.03	15.38	100	0

^a *nxrA* not significant in multiple variable model with FDvar_C : N

7) Potential leached NH₄-N (Best original final model % variation explained by fixed effects = 39.73 (15.94% plant traits / 84.06% microbial traits))

Parameters retained in best final model	Significant co-linearities with other individually significant variables dropped from final model.			Most parsimonious alternative multiple variable models fitting co-linear variables in place of original final model parameters					
		p value	Adjusted R ²		p value	Wald	% variation explained by fixed effects	proportion of % variation explained due to plant traits	proportion of % variation explained due to microbial traits
CWM_SLA	None								
DEA	None								

Article 4

Influence of above- and below-ground plant traits on the structure and function of grassland soil microbial communities

**Legay N, Baxendale C, Grigulis K, Krainer U, Kastl E, Schlöter M, Bardgett R,D,
Arnoldi C, Bahn M, Dumont M, Poly F, Pommier T, Clément JC, Lavorel S**

Submitted to Ecology

Abstract

Soil abiotic properties are known to be major drivers of the structure and activity of soil microbial communities. In contrast, our understanding of how the functional structure and diversity of plant communities influences soil microbial properties remains relatively limited. Existing evidence on this topic is mostly restricted to easily measurable above-ground plant traits, whereas the role of below-ground traits, which are more likely to be linked to microbial community structure, is less well understood. In this study, we investigated, in upland grasslands distributed across three European sites, the relative contributions of soil abiotic characteristics, and above-ground and below-ground plant traits to variations in microbial processes involved in the nitrogen (N) cycle, including potential soil microbial nitrification and denitrification enzymatic activities, and the abundances of microbial genes associated with N cycling, including the abundances of ammonium oxidizing archaea and bacteria, nitrite oxidizers (*Nitrospira* and *Nitrobacter*), and nitrite reducers (harboring the *nirK* and *nirS* genes). As expected, direct effects of soil abiotic parameters were found to be the greatest on N-related microbial abundances and processes. Variations in soil abiotic conditions, including soil pH and nutrient availability, reflected historical and present management, and were the primary drivers of soil microbial functional parameters. In addition, while they explained little of the variance in microbial activities, indirect pathways via above-ground and below-ground plant functional traits contributed substantially to explaining abundances of the investigated microbial communities. Of these, the strongest effects on microbial gene abundances were from below-ground traits, suggesting that these traits were the most relevant to community structure of soil microbes involved in nitrification and denitrification. Together, these results strongly support the inclusion of plant traits, and especially below-ground traits, to improve the predictability of the structure and function of grassland soil microbial communities.

Key words: leaf traits, root traits, ammonium oxidizing archaea and bacteria, nitrite oxidizers, nitrite reducers, mountain grasslands, nutrient availability, soil pH.

Introduction

Soil physico-chemical properties act as major drivers of ecosystem processes such as nitrogen (N) and carbon (C) cycling through their effects on plants (Grime, 1977; Tilman, 1985) and microbial communities (Patra *et al.*, 2006; Bremer *et al.*, 2007; Le Roux *et al.*, 2008). Recently, plant functional trait approaches have emerged as a powerful tool for identifying the mechanisms by which plant-soil-microbial interactions influence microbial communities and the ecosystem processes that they drive from the individual plant to the landscape scale (Orwin *et al.*, 2010; De Vries *et al.*, 2012; Grigulis *et al.*, 2013).

The impact of soil properties on plant traits and on some soil microbial functional parameters is well established. For instance, it is broadly accepted that soil abiotic properties, such as nutrient availability, determine the prevalence of certain plant functional traits (Grime, 1977, Ordoñez *et al.*, 2009). Nutrient-rich grasslands are dominated by fast-growing exploitative species, characterized by high specific leaf area (SLA), leaf N concentration (LNC) (Lavorel & Garnier, 2002) and root N concentration (RNC) (Bahn *et al.*, 2006; Roumet *et al.*, 2006), whereas in grasslands with lower concentrations of available nutrients, high leaf dry matter content (LDMC), high leaf C:N ratio, low RNC and specific root length (SRL) reflect dominance by slow-growing, conservative species (Eissenstat, 2000). Soil abiotic properties such as soil texture, pH, and nutrient and water availability influence not only plant traits, but also soil microbial communities and the nitrogen turnover processes that they drive. For example, it has been shown that pH, nutrient quality and availability affected microbial activities such as denitrifying enzyme activity (DEA) (Henry *et al.*, 2008; Salles *et al.*, 2009), nitrifying enzyme activity (NEA), and gene abundance of microbial nitrifiers, such as ammonium oxidizing archaea (AOA) or bacteria (AOB) (Le Roux *et al.*, 2008), or of microbial denitrifiers (Bremer *et al.*, 2007; Bannert *et al.*, 2011). Vice versa it is well known that plants and their associated microbes highly influence chemical and physical soil properties like soil organic matter or the redox status of a soil (Bannert *et al.*, 2011).

There is also clear evidence that plants have a pronounced influence on microbial community structure and function, mainly in the rhizosphere or detritosphere, but other soil compartments might be influenced as well. Interspecific differences in plant litter quality have been shown to influence microbial communities and N mineralization (Wardle 1992, Steltzer & Bowman, 1998, De Deyn *et al.*, 2008). Root exudates of individual species may influence microbial communities and/or nutrient cycling through quantity (Griffiths *et al.*, 1999, Van der krift *et al.*, 2001, Kuzyakov, 2006) and quality (Grayston *et al.*, 1998, De Deyn *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2008). Simultaneously, soil microbes strongly influence plant performance and

have been considered as the plants' second genome (Berendsen *et al.*, 2012). This includes several strong positive or negative interactions in which different types of microbes are involved such as N-fixing bacteria, mycorrhizal fungi or microbial pathogens (Van der Heijden *et al.*, 2008).

However it remains difficult to generalize and use this recent knowledge about the interactions between abiotic soil parameters, the soil microbiome and plants. In fact the vast majority of studies have focused on single plant species or cultivars, and not on *in situ* species-rich plant communities with their functional traits. A few recent studies have considered the effects of plant functional traits on soil microbes, focusing either on leaf traits alone (Laughlin *et al.*, 2011; De Vries *et al.*, 2012) or specifically on root traits (Porazinska *et al.*, 2003; Valé *et al.*, 2005; Pohl *et al.*, 2011). To our knowledge, only two studies have considered simultaneously above-ground and below-ground plant traits effects on microbial functional parameters (Birouste *et al.*, 2012, Orwin *et al.*, 2010). Birouste *et al.*, (2012) analyzed decomposability and fine root traits in controlled conditions, and found that as with leaf traits, root decomposability was strongly linked to chemical root traits rather than structural root traits. Orwin *et al.*, (2010) reported that root biomass, which is not a functional trait *sensu stricto*, along with RNC and root C concentration (RCC), were not strongly related to leaf traits and litter decomposability, but showed some of the strongest relationships to microbial community structure (soil microbial biomass and fungal to bacterial PLFA ratio), and highlighted the dichotomy of the effects of root and leaf quality on ecosystem functioning. However, both studies were performed under controlled experimental conditions and did not incorporate variation in abiotic soil properties as present under field conditions. Thus, to our knowledge, no study to date has tested for the relative effects of leaf and root functional traits on soil microbial communities and their activities under field conditions.

In this study we investigated the contribution of plant above-ground and below-ground traits over and above direct effects of abiotic soil properties, to variation in the abundance of functional microbial groups and their resulting activity patterns in grassland ecosystems. We applied the conceptual and statistical approach developed by Grigulis *et al.*, (2013), who quantified the relative contribution of plant traits and microbial parameters to variations in ecosystem processes. First, we focused on the effects of: (i) soil nutrients and pH; and (ii) plant above-ground and below-ground traits on a set of microbial functional parameters associated with N cycling, by analyzing sequentially direct effects of soil abiotic properties, and then the additional effects of plant traits. Second, we investigated the relative contributions of above-ground and below-ground plant traits to the overall effects of plant traits on variations in

microbial functional parameters, considering the potential correlations among these traits (Craine *et al.*, 2001). These analyses were carried out for a set of grasslands with different land-use intensities across three European sites, where different land-use intensities within each site provided a broad range of variation in plant functional traits, soil properties and microbial functional parameters. We hypothesised that: (1) in grasslands soils, plant traits highly influence microbial community structure in the top soil compartment due to their dense rooting net, and drive together with abiotic soil parameters the microbial mediated turnover processes; (2) below-ground plant traits, which are in more direct contact with soil microbial communities, are more appropriate than above-ground plant traits for estimating variation in microbial functional parameters. Ultimately, our goal was to identify which chemical and structural leaf and root traits were most appropriate, in addition to abiotic parameters, for quantifying the variation of microbial functional parameters in grassland soils.

Methods

Field sites description

Grasslands were sampled for vegetation and soil properties at three field sites across Europe, at the Lautaret Pass (French Alps), the Stubai Valley (Austrian Alps), and the Yorkshire Dales (United Kingdom). These sites were selected to provide a range of grasslands typical of western European upland regions. Moreover, they cover a range of intensities of agricultural activity and their recent changes, including abandonment of management, intensification of production grassland through fertilisation, and biodiversity restoration for agri-environmental objectives. These sites cover a range of fertilities for semi-natural grasslands spanning a range of N availability and associated vegetation communities (Appendix 1). The past and present management of these different grasslands has been fully described in previous studies (see Grigulis *et al.*, 2013). Briefly, at the French site, three grassland types were chosen along a gradient from medium N availability to poor N availability: two on terraced slopes; of which one is mown for hay in early August, and the second is not mown but lightly grazed. The third grassland type is untterraced and only very lightly grazed during travel of livestock to summer pastures. At the Austrian site, two grassland types were chosen along an intensity gradient; the first is an intensive meadow with high fertilizer application and two or three vegetation cuts a year, and the second is an abandoned meadow which was previously mown and grazed and is now colonized by trees and shrubs. The UK site is characterised by a long-term fertilisation gradient. The most intensively managed meadow is subject to high rates of fertiliser application with multiple vegetation cuts per year and heavy inter-season grazing. The second is a meadow with fertiliser application, a single annual hay cut and inter-season grazing. The third type is a traditionally managed species-rich hay meadow with light inter-season grazing, a single annual hay cut and low fertiliser inputs.

Sampling strategy

Within each site, 3 replicate fields were sampled for each of 2-3 management types. Within each replicate field, soil and vegetation were sampled in 4 fixed quadrats (50x50 cm) during peak biomass at the end of June, early July and end of July 2010 for the English, French and Austrian sites respectively. Vegetation was cut at the centre of each quadrat (30x30 cm) and 5 soil cores (4.5 cm Ø, 10 cm depth) were taken from each quadrat. Four cores from each of the 4 corners were sampled simultaneously and subsequently pooled for soil analysis, and a single core was taken from the centre for root traits analyses. One extra core (6 cm Ø, 6 cm

depth) was sampled next to the root core for measurement of bulk density and parameters related to soil water availability (see next section).

Soil and microbial analysis

Fresh composite soil samples from each plot were weighed and passed through a 5.6 mm sieve. Fresh sieved soil was stored at -20°C (for further phospholipid analysis, DNA extraction and quantification of gene abundance,) or 4°C and immediately (within 48h) processed for the determination of microbial biomass and enzymatic activities, soil moisture, soil organic matter content, pH, soil texture (using soil subsequently passed through a 2mm sieve) and soil nutrients (ammonium (NH_4^+ -N), nitrate (NO_3^- -N), total dissolved nitrogen (TDN), and dissolved organic nitrogen (DON)) from 0.5 M K_2SO_4 soil extracts (Jones and Willett, 2006) using a FS-IV colorimetric chain (OI-Analytical Corp., TX, USA). *In situ* available soil inorganic N was measured using ion exchange resin bags. In each plot, resin bags were inserted in the ground (5-15 cm deep at a 45° angle) over the growing season at 6 weeks intervals from May until October (4 times), once over the winter period (November to April), and during the following growing season from May to October 2011 (4 times). Resin bags were made using nylon bags (10×5 or 5×5 cm) containing 5 g of mixed anion cation exchange resin (Amberlite IRN150, VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France). Captured nitrate and ammonium were released from the resins in KCl 1M and analyzed on a FS-IV colorimetric chain (OI-Analytical, College Station, TX, USA). Subsamples of fresh soil were dried at 70°C for one week to determine soil water content (SWC), followed by 4h at 550°C to determine soil organic matter content (SOM). Soil subsamples were air dried and ground to measure total soil C and N with an FlashEA 1112 elemental analyser (Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and soil pH was measured using a 1:4 (soil: distilled water) solution. Bulk density and soil porosity were obtained measuring the dry mass of a fixed volume (205 cm³) soil core. Prior to drying, 100 ml of distilled water were added to saturate each soil core and allowed calculating water holding capacity and water filled pore space.

Fungal and bacterial biomass were determined using phospholipid fatty acid (PLFA) analysis, using the Bligh and Dyer method (1959), adapted by White *et al.* (1979) and described by Bardgett *et al.* (1996). Briefly, this involved the extraction, fractionation and quantification of microbial phospholipids. The fatty acids i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 17:0, i17:0, cy17:0, cis18:1 ω 7 and cy19:0 were chosen to represent bacterial fatty acids and 18:2 ω 6 to represent fungal fatty acids, and total PLFA was used as a measure of active microbial biomass (Bardgett

and McAlister, 1999). Microbial biomass nitrogen (N), was measured using the chloroform-extraction fumigation technique of Vance, Brookes & Jenkinson (1987).

Kinetic parameters (V_{max} and K_m) of potential nitrification were measured following a protocol adapted from Koper *et al.* 2010 and Dassonville *et al.* (2011). Potential denitrification enzyme activity (DEA) was measured according to Attard *et al.* (2011). Abundance of nitrifiers (ammonium oxidizing archaea - AOA and ammonium oxidizing bacteria - AOB) as well as nitrite oxidizers (Nitrospira - NIP and Nitrobacter - NIB) were quantified based on the gene copy numbers present in soil of ammonium monooxygenase gene *amoA* (amoA-AOA amoA-AOB) and 16S rRNA of NIP and *nrxA* of NIB respectively. Abundances of denitrifiers were measured based on the abundance of the nitrite reductase genes (*nirK* (NRK) and *nirS* (NRS)). Details on the respective protocols for quantitative real time PCR can be found in Grigulis *et al.* (2013).

Plant trait analysis

Vegetation composition was quantified in each replicate field using the Botanal method (Lavorel *et al.*, 2008), and aboveground plant traits (SLA, LNC, leaf C concentration (LCC), leaf C:N ratio, LDMC, Height) were measured using standardized protocols (Cornelissen *et al.*, 2003). Community weighted mean traits and functional divergence were calculated following Casanoves *et al.* (2011). As analyses did not retain any functional divergence effects, there are not reported. A more detailed protocol of vegetation sampling and trait measurements is given by Grigulis *et al.* (2013).

Roots were sampled from a dedicated soil core in each of 4 quadrats per field, which was weighed before careful washing in tepid water to allow separation of roots by floatation. Roots were placed into an alcohol solution (ethanol 10%, acetic acid 5% v: v) and stored at 4°C to maintain freshness until root morphology measurements using digital scanning. Before analysis, roots were suspended in 1 cm of demineralised water in a 29 × 42 cm clear acrylic tray and scanned at 300 dpi with a flatbed scanner. Each digital root image was processed using WINRHIZO software (Regent Instruments Inc., Canada) to determine total root length and average root diameter. Roots were then weighed, dried at 70°C, and reweighed to calculate root dry matter content (RDMC) and SRL. Finally, dry roots were ground to a fine powder for analysis of N and C concentrations. Being obtained from community level soil cores, these root traits measures represented community weighted means.

We divided plant traits into two categories: chemical traits included LNC and LCC, and RNC and RCC, and structural traits included LDMC, RDMC, vegetative height, SRL and root

diameter. Two additional structural root properties were calculated, namely total root length and root mass per mass of soil.

Data analysis

We used correlative modelling to quantify the respective contributions of soil properties and plant traits to variation in microbial functional parameters. Data were analysed using a hypothesis driven process, using linear mixed models with restricted maximum likelihood (REML) estimates (Grigulis *et al.*, 2013). Briefly, linear mixed models are a powerful class of models that are, in particular, appropriate for the analysis of grouped or clustered data. Thus, in our model, grasslands were considered as replicates grouped within each of the three experimental sites (Stubai, Lautaret, Yorkshire Dales). The REML algorithm, by associating common random effects to observations within the same group, allows for the specification of the covariance structure induced by the grouping of the data and provides estimations of parameter effects and variance components for both fixed and random effects in the model. Analyses were carried out using the average information (AI) algorithm to estimate variance parameters using the software package Genstat 11th Edition (VSN International, Hemstead, UK). All variables were tested for normality, and log transformations applied, as required, prior to analysis. In order to provide an objective methodology for the selection of the most parsimonious model, analyses were conducted following Díaz *et al.* (2007). First, we determined the effect of each of the soil properties and plant trait parameters in isolation on each of the microbial functional parameters, using a series of single explanatory variable REML linear models. Second, in order to develop multi-variable models for each microbial trait, a hierarchical approach was used in which soil properties, significant in the single variable models, were first fitted as fixed factors, with plant effects, significant in the single variable models, being fitted afterwards. This bottom-up approach was based on the assumption that soil properties have a larger influence on microbial traits than plant traits (Grigulis *et al.*, 2013), and hence residual plant effects were considered once impacts of soil properties had been accounted for.

Final combined models reported variance explained by sites, and once this variance was accounted for, the variance explained by soil properties and by plant traits respectively. In addition, within plant traits we examined the relative contributions to variance of above- and belowground traits, as well as the prevalence of structural vs. chemical traits among selected traits.

Results

Relative importance of abiotic soil properties and plant traits on the abundance of microbial gene and potential activities

Variation across the experimental sites explained 7 % (NIB) to 98 % (fungal to bacterial PLFA ratio) of the total variation in microbial functional parameters (Table 1). After inter-site variation was accounted for, models combining soil abiotic properties and/or plant traits explained from 25 % (i.e. Km) to 93 % (i.e. Vmax) of the remaining variation in microbial functional parameters.

Effect of soil abiotic properties on microbial community structure and functioning

Five of the 14 studied microbial functional parameters, Km, Vmax, NRS, NIP and AOA:AOB ratio, were influenced only by soil fertility indicators and/or pH (Table 1), and, once site variation was removed, gave models explaining between 25% (Km) and 93% (Vmax) of variation. Specifically, except for the AOA:AOB ratio, these microbial functional parameters were positively correlated to soil pH. Not surprisingly, microbial gene abundances and activities related to nitrification (i.e. AOA:AOB ratio, NIP and Vmax) were linked to the substrate or products (i.e. NH_4^+ or NO_3^-) of nitrification. Soil pH and total soil C content explained a large proportion of the variation in MBN (97%) (Table 1).

Role of plant traits for microbial community structure and functioning

The addition of plant traits, particularly below-ground traits, increased the explanatory power of models for the other 9 microbial functional parameters, namely fungal to bacterial PLFA ratio, AOA, AOB, NIB, NIP:NIB ratio, NRK, NRK:NRS ratio and DEA. Except for NRK:NRS ratio, for which only plant traits (root C:N and vegetative height) and no soil properties were retained, all other microbial activities and gene abundances were influenced by combined effects of soil properties and plant traits. The variation explained by this set of parameters varied from 57% (fungal to bacterial PLFA ratio) to 90% (microbial biomass N) (once site variation was removed), with 3% to 100% of that variation explained by plant traits (Table 1). The role of plant traits in explaining the variation of microbial functional parameters was present in models for both the nitrification and denitrification process, as well as for the fungal to bacterial PLFA ratio. In the following section, we focus on the most relevant models having a strong contribution of plant traits.

Plant traits explained about half of the within-site variation in the fungal to bacterial PLFA ratio, which was strongly and negatively related to the single below-ground trait root diameter

(48% of the 57% explained by fixed effects). Total soil C concentration and soil DON accounted for the other half of explained within-site variation, showing negative and positive correlations respectively with the fungal to bacterial PLFA ratio (Table 1, Figure 1).

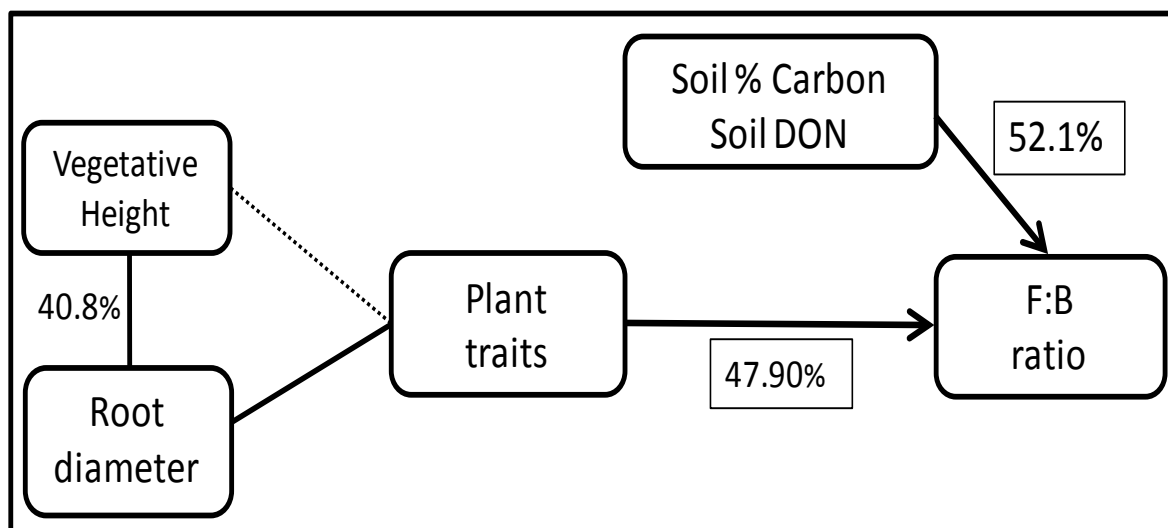


Figure 1: Schematic diagram showing potential links and pourcentages of explanation of soil properties and plant traits on the fungal to bacterial PLFA ratio.

Overall, four of the six models for microbial gene abundances involved in nitrification processes retained plant traits (Table 1). For example, 71% of within-site variation in the gene abundance of *amoA* from AOB were explained by a model combining a positive relationship with one soil parameter (*in situ* available soil NH_4^+) and a negative one with two plant traits (RDMC and root length by soil mass) (Table 1). In this model, the addition of plant traits improved the model fit by 22%, leading to a total of 75% of the variance explained. Likewise, the abundance of NRK, a gene involved in denitrification, showed a strong positive relationship with the root C:N ratio, which contributed 52.7% of the 74% of explained within-site variance. In addition, NH_4^+ availability was positively related to NRK and improved model fit by 35% (Figure 2, Table 1). The ratio of NRK to NRS denitrification genes on the other hand, was exclusively explained by two plant traits (root C:N ratio and vegetative height) (Table 1). The potential denitrification enzyme activity (DEA) was strongly influenced by soil parameters, with total soil C concentration and $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ explaining most (87%) of its within-site variation, with LCC explaining the remaining 13%.

Relative effects of different plant traits

We observed a statistical independence between above-ground and below-ground plant traits. Chemical root traits and one structural trait (i.e. RDMC) varied only weakly across sites, whereas site effects were stronger for other structural traits and root properties (Table 2). Above-ground traits explained more than 50% of the variation in below-ground properties and traits, once site variation had been removed. Chemical below-ground traits were mostly correlated to chemical leaf traits, except for RCC which was related to vegetative height. Structural below-ground traits were also linked to chemical leaf traits, except for root diameter which was exclusively linked to vegetative height. Our results showed that some below-ground traits, including root C:N ratio and RDMC, captured a greater proportion of explained variation of microbial functional parameters than above-ground plant traits when retained in their respective models (Table 3). Chemical and structural traits differed in their contributions to variation in microbial functional parameters, with structural traits, such as root diameter, RDMC and vegetative height, being retained in more models with microbial abundance parameters than chemical traits, such as leaf or root C:N ratio (Table 3). However, when retained in models (as for NRK and NRK:NRS ratio), chemical root traits, such as root C:N ratio, contributed a greater proportion of explained variation (53% and 75% respectively) as compared to soil properties (Table 1 and 3).

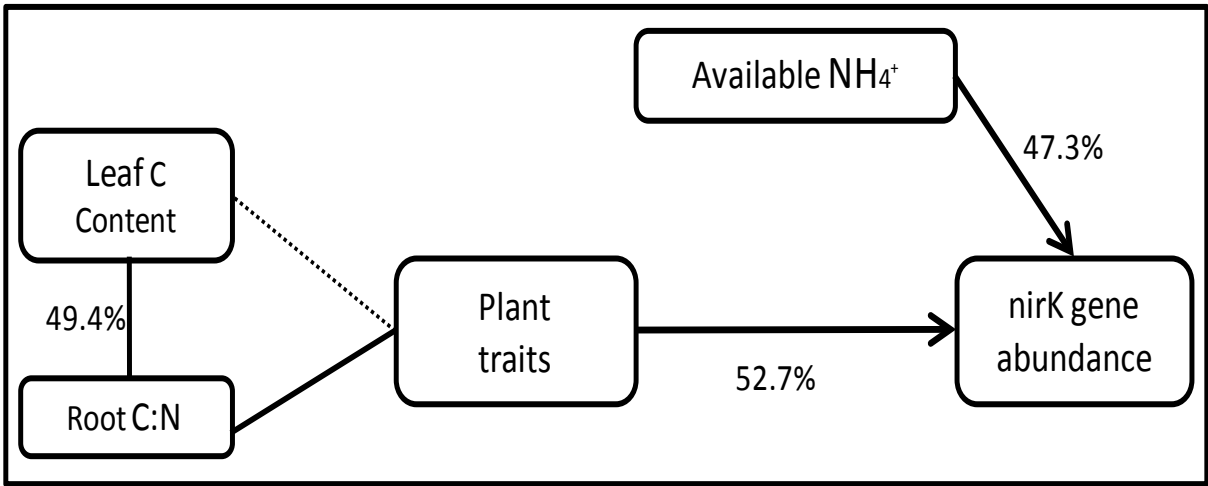


Figure 2: Schematic diagram showing potential links and pourcentages of explanation of soil properties and plant traits on NRK gene abundance.

Discussion

The principal aim of this study was to investigate the combined influence of plants and soil abiotic properties on soil microbial communities in mountain grasslands. Specifically we tested the relative importance of (i) direct effects of soil pH, nutrient contents and water availability on abundances and activities of key soil microbial groups associated with nitrification and denitrification, and (ii) plant trait (above-ground and below-ground) effects, including both direct plant effects and indirect soil effects on plant traits. Analysing a data set covering a range of climate, soil and management conditions (Appendix 1), we found that although soil abiotic properties explained, as expected, most variation in these microbial functional parameters (Girvan *et al.*, 2003, Kennedy *et al.*, 2004, Bremer *et al.*, 2007, Harrison & Bardgett, 2010), plant traits also had an important, albeit secondary role.

Overall, our findings indicate the importance of incorporating both above-ground and below-ground plant traits, as well as soil abiotic properties, to predict variations in soil microbial functional parameters associated with N cycling. Although several above-ground and below-ground plant traits were correlated (Table 2) (Birouste *et al.*, 2012; Freschet *et al.*, 2010), consistent with Orwin *et al.* (2010) each of these compartments provided significant and independent sources of variation in soil microbial community composition and functional parameters. Moreover, below-ground traits retained in models, including root C:N ratio and RDMC, captured a greater proportion of explained variation than above-ground traits such as SLA or leaf C:N ratio. Lastly, the largest contributions of plant traits to variation in soil microbial functional parameters were related to chemical, rather than structural (root) traits. In the following sections we briefly discuss effects of soil abiotic properties on microbial functional parameters, and then turn to mechanisms underpinning observed trait effects.

Soil abiotic properties and microbial functional parameters

As expected, soil effects on variation in microbial functional parameters were large. Thus, abiotic soil properties (pH and nutrient availability) constituted major drivers of soil microbial activities and abundances as demonstrated in numerous studies (Fierer and Jackson, 2006; Leininger *et al.*, 2006; Hallin *et al.*, 2009; De Vries *et al.*, 2012). Although soil water availability was tested in single or multiple REML models among other explanatory variables for each of the microbial parameters (Appendix 2), it was never retained in final models. This was probably due to its correlation with other parameters with stronger effects such as total soil total N or ammonium concentrations. In contrast, soil pH strongly influenced many microbial functional parameters (e.g. NEA, AOA, NIP, MBN) and, when retained in models, it had the

largest contribution to total explained variation (Fierer and Jackson, 2006; Eskelinen *et al.*, 2009; Laughlin *et al.*, 2011). Soil nutrient availability (NH_4^+ and NO_3^-), which influences microbial growth and activity, also strongly explained variation in microbial functional parameters, as expected (Henry *et al.*, 2008; Attard *et al.*, 2010; Verhamme *et al.*, 2011).

Plant traits effects on microbial processes

To our knowledge, no other study has linked above-ground and below-ground plant traits with both soil microbial activities and microbial gene abundances associated with N cycling. The inclusion of plant traits significantly improved statistical models, both for parameters relevant to nitrification and denitrification. In one case, (i.e. NRK:NRS ratio), plant traits were the only parameters retained in the final model, and for two measures, namely fungal to bacterial PLFA ratio and NRK, root traits predicted a large portion of the variation.

A few recent studies have highlighted significant effects of plant traits on soil microbial biomass and activities at the individual plant, ecosystem, and landscape scale (Orwin *et al.*, 2010; Laughlin *et al.*, 2011; De Vries *et al.*, 2012). We identified a significant negative correlation between root diameter and the fungal to bacterial PLFA ratio (F/B ratio), which is commonly used as a measure of the composition of microbial communities and has been linked to soil biogeochemical processes (Van der Heijden *et al.*, 2008). Previous studies have identified links between the F/B ratio and SLA at the community level (negative relationship; de Vries *et al.*, 2012), or with rooting density of individual species (positive relationship; Orwin *et al.*, 2010). These authors suggested that an increase in the F/B ratio was concomitant with an increase in plant traits characterizing slow-growing species in nutrient-poor and/or carbon-rich environments. Consistent with this hypothesis, we found that thinner roots, which are characteristic of slow-growing plants that are common in nutrient poor environment (Craine *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2006), were positively associated with the F/B ratio. Nevertheless, the link observed between root traits and the F/B ratio is controversial and should be considered with care because of the potential contribution of root cells to the abundance of polyunsaturated PLFAs such as 18:2 ω 6 (Zelles, 1997; Kaiser *et al.*, 2010), even after sieving and manual removal of root fragments. Surprisingly, we observed a negative relationship between total soil C concentrations and F/B ratios, which contrasts recent findings (De Vries *et al.*, 2012). A plausible explanation is that a decrease in total soil C could reflect mainly a drop in labile soil C content, which usually favors bacterial communities at the expense of fungal communities (Fontaine & Barot, 2005).

Plant traits also contributed to explaining the variation in microbial functional gene abundances, but had low contribution to variation in potential microbial activities (i.e. 0% for nitrification and 13% for denitrification). In fact, all variation in N-related microbial activities was predicted by soil parameters as they controlled the availability of nutrients used by these microbial processes, and thereby outweighed any direct plant trait influences. The most influential plant trait predicting variation in the abundance of genes involved in nitrification (e.g. AOA, AOB and NIB) was RDMC, with only root length and leaf C:N also being retained in models of the gene abundance of nitrifiers. To our knowledge, this is the first study linking plant traits with the abundance of these nitrifier gene abundances. It supports recent results showing a relationship between leaf traits and nitrification through litter quality in a forest ecosystem (Laughlin *et al.*, 2011). Such relationships between RDMC and nitrifiers gene abundance could be mediated by N availability because both RDMC (Craine *et al.*, 2001) and nitrifiers gene abundance (Attard *et al.*, 2010; Verhamme *et al.*, 2011) are known to be strongly linked to soil nutrient availability. Thus, the statistical contribution of RDMC to the variation of nitrifier gene abundances may result from simultaneous responses of this root trait and the nitrifiers communities to a change of soil nutrient availability.

Concerning denitrifier gene abundances, two of the three studied parameters (NRK and NRK:NRS ratio) were primarily predicted by plant traits (Table 1). In both cases, the root C:N ratio was the most significant variable. As root exudate quality impacts on microbial communities (Griffiths *et al.*, 1999), we hypothesize that root C:N ratio is a proxy of exudate quality and production (Valé *et al.*, 2005), and notably a proxy of the exudate C:N ratio which directly influences microbial communities (Bremer *et al.*, 2007, Henry *et al.*, 2008). Nevertheless, more studies are needed concerning root exudates quality and their assimilation by microbial communities to support this hypothesis. Although unlikely since sampling was done in early summer, an indirect effect of root decomposition cannot be excluded. We can also suppose that a high root C:N ratio could be related to weak N uptake by plants (Craine *et al.*, 2003). These are typical plant traits in nutrient poor environments where soil NO_3^- availability is low, which may also impact the abundance of some denitrifiers. Finally, leaf traits showed significant effects in models of NRK:NRS ratio and DEA, improving model fit by 25% (with vegetative height) and 13% (with LCC) respectively. We suggest that such effects reflect an indirect above-ground effect linked to litter quality, since LCC (Wardle *et al.*, 1992) has been described as a marker of litter quality, similarly to vegetative height for one of our study site (Lavorel and Grigulis, 2012). Litter quality, by conditioning the nature of C sources available for microbes, influences N transformation (Falcão Salles *et al.*, 2012) and

may impact the abundance of microbial communities and their ability to use this substrate (Wardle *et al.*, 1992).

Relative importance of different plant traits to variation in microbial functional parameters

The relative abundance of microbial genes related to key N-processes were in some cases significantly related to both above-ground and below-ground plant traits. As detailed above, small set of below-ground plant traits (root diameter, RDMC, root C:N ratio) were the most influential in predicting variation in microbial community structure. Although the chemical root trait, root C:N ratio contributed a greater proportion when retained in models (53% and 75% for NRK and NRK:NRS ratio respectively), there was no clear pattern for us to firmly recommend more effective chemical or structural traits. However, all of the selected root traits were linked to plant nutrient uptake capacity (Craine *et al.*, 2003), and were likely to be highly influenced by soil nutrient availability (Craine *et al.*, 2001), and have also been suggested to influence root exudates quantity and quality (Valé *et al.*, 2005). To summarize, the strong contribution of root traits to statistical models of microbial parameters could thus be related to two potential mechanisms. On one hand, root traits reflect plant responses to soil parameters including pH and nutrient conditions, with effects on microbial activities and community structure additional to direct impacts of these parameters. On the other hand, root traits determine the amount and the quality of plant C and N supply to soil microbial communities (mainly denitrifiers), which both depend on soil nutrient status and plant nutrient uptake (Van der Krift *et al.*, 2001) but may also be influenced by the strength of the C sink in microbial communities (see Wright *et al.*, 1998; Kaschuk *et al.*, 2009 for arbuscular mycorrhizal fungi communities; Bahn *et al.*, 2013).

Conclusion

In conclusion, this study highlighted the importance of incorporating plant traits, and especially below-ground traits, in analyses of variation in soil N-related microbial activities and community structure. We found that soil abiotic properties, including soil pH and nutrient availability reflecting historical and present management, were the primary drivers of soil microbial functional parameters, as might be expected. Indirect pathways *via* above-ground and below-ground plant functional traits explained additional variation in microbial community structure (microbial gene abundances of N-related processes and F/B ratio) across grassland communities, though they had limited direct predictive power for potential microbial activities.

Below-ground traits had the strongest contribution to statistical models, suggesting, logically, that they were the most closely linked to microbial community. We explain these finding by coordinated responses of plant traits and microbial communities to soil abiotic conditions, and likely in turn, an influence of plants and microbes on soil properties. Further investigations through targeted experiments such as isotopic labeling methods are required to understand the mechanisms involved in indirect effects from soil abiotic properties to microbial functional parameters *via* plant functional traits.

Acknowledgements:

This study was conducted as part of ERA-Net BiodivERsA project VITAL, ANR-08-BDVA-008, with the national funders ANR, FWF, NERC, BMBF and Austrian Science Fund (FWF project number I 242-B17). The Lautaret site is part of the long term research site Zone Atelier Alpes, a member of the ILTER-Europe and LTSER networks. The sites at Stubai are part of the LTSER platform Tyrolean Alps. We acknowledge the Joseph Fourier Alpine research station (CNRS UMS 3370) for infrastructure support, and Edith Primat, Hanna Secher-Frommell and Marie-Pascale Colace for help with field and lab measurements at Lautaret. We thank Nadine Guillaumaud for her support in the field campaign and her help for the measurements of microbial activities on the AME platform (UMR5557-USC1364).

Literatures cited

- Attard, E., S. Recous, A. Chabbi, C. De Berranger, N. Guillaumaud, J. Labreuche, L. Philippot, B. Schmid, and X. Le Roux. 2011. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology* 17:1975-1989.
- Attard, E., F. Poly, C. Commeaux, F. Laurent, A. Terada, B. F. Smets, S. Recous, and X. Le Roux. 2010. Shifts between Nitrospira- and Nitrobacter-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. *Environmental Microbiology* 12:315-326.
- Bahn, M., M. Knapp, Z. Garajova, N. Pfahringer, and A. Cernusca. 2006. Root respiration in temperate mountain grasslands differing in land use. *Global Change Biology* 12:995-1006.
- Bahn, M., F. A. Lattanzi, R. Hasibeder, B. Wild, M. Koranda, V. Danese, N. Bruggemann, M. Schmitt, R. Siegwolf, and A. Richter. 2013. Responses of belowground carbon allocation dynamics to extended shading in mountain grassland. *New Phytologist* 198:116-126.
- Bannert, A., K. Kleineidam, L. Wissing, C. Mueller-Niggemann, V. Vogelsang, G. Welzl, Z. H. Cao, and M. Schlöter. 2011. Changes in Diversity and Functional Gene Abundances of Microbial Communities Involved in Nitrogen Fixation, Nitrification, and Denitrification in a Tidal Wetland versus Paddy Soils Cultivated for Different Time Periods. *Applied and Environmental Microbiology* 77:6109-6116.
- Bardgett, R.D. and Wardle, D.A. 2010. Aboveground-Belowground Linkages - Biotic Interactions, Ecosystem Processes and Global Change. Oxford University press, New York. pp. 301.
- Bardgett, R. D., G. B. De Deyn, and N. J. Ostle. 2009. Plant-soil interactions and the carbon cycle. *Journal of Ecology* 97:838-839.
- Bardgett, R. D., P. J. Hobbs, and A. Frostegard. 1996. Changes in soil fungal:bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils* 22:261-264.
- Bardgett, R. D. and E. McAlister. 1999. The measurement of soil fungal : bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology and Fertility of Soils* 29:282-290.
- Berendsen, R. L., C. M. J. Pieterse, and P. A. H. M. Bakker. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17:478-486.

- Birouste, M., E. Kazakou, A. Blanchard, and C. Roumet. 2012. Plant traits and decomposition: are the relationships for roots comparable to those for leaves? *Annals of Botany* **109**:463-472.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**:911-917.
- Bremer, C., G. Braker, D. Matthies, A. Reuter, C. Engels, and R. Conrad. 2007. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of nirK-Type denitrifier communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:6876-6884.
- Casanoves, F., L. Pla, J. A. Di Rienzo, and S. Diaz. 2011. FDiversity: a software package for the integrated analysis of functional diversity. *Methods in Ecology and Evolution* **2**:233-237.
- Cornelissen, J. H. C., S. Lavorel, E. Garnier, S. Diaz, N. Buchmann, D. E. Gurvich, P. B. Reich, H. ter Steege, H. D. Morgan, M. G. A. van der Heijden, J. G. Pausas, and H. Poorter. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* **51**:335-380.
- Craine, J. M., J. Froehle, G. D. Tilman, D. A. Wedin, and F. S. Chapin. 2001. The relationships among root and leaf traits of 76 grassland species and relative abundance along fertility and disturbance gradients. *Oikos* **93**:274-285.
- Craine, J. M., D. A. Wedin, F. S. Chapin, and P. B. Reich. 2003. Relationship between the structure of root systems and resource use for 11 North American grassland plants. *Plant Ecology* **165**:85-100.
- Dassonville, N., N. Guillaumaud, F. Piola, P. Meerts, and F. Poly. 2011. Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*): impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biological Invasions* **13**:1115-1133.
- De Deyn, G. B., J. H. C. Cornelissen, and R. D. Bardgett. 2008. Plant functional traits and soil carbon sequestration in contrasting biomes. *Ecology Letters* **11**:516-531.
- de Vries, F. T., P. Manning, J. R. B. Tallowin, S. R. Mortimer, E. S. Pilgrim, K. A. Harrison, P. J. Hobbs, H. Quirk, B. Shipley, J. H. C. Cornelissen, J. Kattge, and R. D. Bardgett. 2012. Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecology Letters* **15**:1230-1239.

- Diaz, S., S. Lavorel, F. de Bello, F. Quetier, K. Grigulis, and M. Robson. 2007. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:20684-20689.
- Eissenstat, D. 2000. Root structure and function in an ecological context. *New Phytologist* 148:353-354.
- Eskelinen, A., S. Stark, and M. Mannisto. 2009. Links between plant community composition, soil organic matter quality and microbial communities in contrasting tundra habitats. *Oecologia* 161:113-123.
- Falcão Salles, J., X. Le Roux, and F. Poly. 2012. Relating phylogenetic and functional diversity among denitrifiers and quantifying their capacity to predict community functioning. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Fierer, N. and R. B. Jackson. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:626-631.
- Fontaine, S. and S. Barot. 2005. Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation. *Ecology Letters* 8:1075-1087.
- Freschet, G. T., J. H. C. Cornelissen, R. S. P. van Logtestijn, and R. Aerts. 2010. Evidence of the 'plant economics spectrum' in a subarctic flora. *Journal of Ecology* 98:362-373.
- Girvan, M. S., J. Bullimore, J. N. Pretty, A. M. Osborn, and A. S. Ball. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1800-1809.
- Grayston, S. J., S. Q. Wang, C. D. Campbell, and A. C. Edwards. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 30:369-378.
- Griffiths, B. S., K. Ritz, N. Ebbelwhite, and G. Dobson. 1999. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology & Biochemistry* 31:145-153.
- Grigulis, K., S. Lavorel, U. Krainer, N. Legay, C. Baxendale, M. Dumont, E. Kastl, C. Arnoldi, R. D. Bardgett, F. Poly, T. Pommier, M. Schlöter, U. Tappeiner, M. Bahn, and J.-C. Clément. 2013. Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services. *Journal of Ecology* 101:47-57.
- Grime, J. P. 1977. Evidence For Existence Of 3 Primary Strategies In Plants And Its Relevance To Ecological And Evolutionary Theory. *American Naturalist* 111:1169-1194.

- Hallin, S., C. M. Jones, M. Schlöter, and L. Philippot. 2009. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *Isme Journal* **3**:597-605.
- Harrison, K. A. and R. D. Bardgett. 2010. Influence of plant species and soil conditions on plant-soil feedback in mixed grassland communities. *Journal Of Ecology* **98**:384-395.
- Henry, S., S. Texier, S. Hallet, D. Bru, C. Dambreville, D. Cheneby, F. Bizouard, J. C. Germon, and L. Philippot. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environmental Microbiology* **10**:3082-3092.
- Hill, J. O., R. J. Simpson, A. D. Moore, and D. F. Chapman. 2006. Morphology and response of roots of pasture species to phosphorus and nitrogen nutrition. *Plant and Soil* **286**:7-19.
- Kaiser, C., A. Frank, B. Wild, M. Koranda, and A. Richter. 2010. Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2 omega 6,9 and 18:1 omega 9. *Soil Biology & Biochemistry* **42**:1650-1652.
- Kaschuk, G., T. W. Kuyper, P. A. Leffelaar, M. Hungria, and K. E. Giller. 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology & Biochemistry* **41**:1233-1244.
- Kennedy, N., E. Brodie, J. Connolly, and N. Clipson. 2004. Impact of lime, nitrogen and plant species on bacterial community structure in grassland microcosms. *Environmental Microbiology* **6**:1070-1080.
- Koper, T. E., J. M. Stark, M. Y. Habteselassie, and J. M. Norton. 2010. Nitrification exhibits Haldane kinetics in an agricultural soil treated with ammonium sulfate or dairy-waste compost. *Fems Microbiology Ecology* **74**:316-322.
- Kuzyakov, Y. 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:425-448.
- Laughlin, D. C. 2011. Nitrification is linked to dominant leaf traits rather than functional diversity. *Journal of Ecology* **99**:1091-1099.
- Lavorel, S. and E. Garnier. 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* **16**:545-556.
- Lavorel, S. and K. Grigulis. 2012. How fundamental plant functional trait relationships scale-up to trade-offs and synergies in ecosystem services. *Journal of Ecology* **100**:128-140.

- Lavorel, S., K. Grigulis, S. McIntyre, N. S. G. Williams, D. Garden, J. Dorrough, S. Berman, F. Quetier, A. Thebault, and A. Bonis. 2008. Assessing functional diversity in the field - methodology matters! *Functional Ecology* 22:134-147.
- Le Roux, X., F. Poly, P. Currey, C. Commeaux, B. Hai, G. W. Nicol, J. I. Prosser, M. Schlöter, E. Attard, and K. Klumpp. 2008. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *Isme Journal* 2:221-232.
- Leininger, S., T. Urich, M. Schlöter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster, and C. Schleper. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442:806-809.
- Ordóñez, J. C., P. M. van Bodegom, J. P. M. Witte, I. J. Wright, P. B. Reich, and R. Aerts. 2009. A global study of relationships between leaf traits, climate and soil measures of nutrient fertility. *Global Ecology and Biogeography* 18:137-149.
- Orwin, K. H., S. M. Buckland, D. Johnson, B. L. Turner, S. Smart, S. Oakley, and R. D. Bardgett. 2010. Linkages of plant traits to soil properties and the functioning of temperate grassland. *Journal of Ecology* 98:1074-1083.
- Patra, A. K., L. Abbadie, A. Clays-Josserand, V. Degrange, S. J. Grayston, N. Guillaumaud, P. Loiseau, F. Louault, S. Mahmood, S. Nazaret, L. Philippot, F. Poly, J. I. Prosser, and X. Le Roux. 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology* 8:1005-1016.
- Pohl, M., R. Stroude, A. Buttler, and C. Rixen. 2011. Functional traits and root morphology of alpine plants. *Annals of Botany* 108:537-545.
- Porazinska, D. L., R. D. Bardgett, M. B. Blaauw, H. W. Hunt, A. N. Parsons, T. R. Seastedt, and D. H. Wall. 2003. Relationships at the aboveground-belowground interface: Plants, soil biota, and soil processes. *Ecological Monographs* 73:377-395.
- Roumet, C., C. Urcelay, and S. Diaz. 2006. Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytologist* 170:357-368.
- Salles, J. F., F. Poly, B. Schmid, and X. L. Roux. 2009. Community niche predicts the functioning of denitrifying bacterial assemblages. *Ecology* 90:3324-3332.
- Steltzer, H. and W. D. Bowman. 1998. Differential influence of plant species on soil nitrogen transformations within moist meadow Alpine tundra. *Ecosystems* 1:464-474.
- Tilman, D. 1985. The Resource-Ratio Hypothesis Of Plant Succession. *American Naturalist* 125:827-852.

- Vale, M., C. Nguyen, E. Dambrine, and J. L. Dupouey. 2005. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. *Soil Biology & Biochemistry* **37**:2329-2333.
- van der Heijden, M. G. A., R. D. Bardgett, and N. M. van Straalen. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**:296-310.
- Van der Krift, T. A. J., P. J. Kuikman, F. Moller, and F. Berendse. 2001. Plant species and nutritional-mediated control over rhizodeposition and root decomposition. *Plant and Soil* **228**:191-200.
- Vance, E. D., P. C. Brookes, and D. S. Jenkinson. 1987. An Extraction Method For Measuring Soil Microbial Biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry* **19**:703-707.
- Verhamme, D. T., J. I. Prosser, and G. W. Nicol. 2011. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *Isme Journal* **5**:1067-1071.
- Wardle, D. A. 1992. A comparative-assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **67**:321-358.
- White, D. C., W. M. Davis, J. S. Nickels, J. D. King, and R. J. Bobbie. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* **40**:51-62.
- Wright, D. P., D. J. Read, and J. D. Scholes. 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* **21**:881-891.
- Zelles, L. 1997. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* **35**:275-294.

Table 1. Fixed effects plant trait and soil property variables retained within the multiple variable REML models for each of the microbial properties. Also presented is the % variation in each microbial property explained by the site, the retained fixed effects, the proportion of explanation afforded by the fixed effects due to plant traits and soil parameters respectively, and the significance (p), Wald statistic and the direction and magnitude of the standardised effect for each of the retained fixed effects. Legend: Root Length SM (root length per gram of dried soil), C:N ratio (carbon : nitrogen content ratio), RDMC (root dry matter content), DON (Dissolved organic nitrogen), NO_3^- and NH_4^+ sorption (in situ nitrate and ammonium absorbed in resin), AOA and AOB (ammonium oxidizing archaea and bacteria respectively), NIP and NIB for nitrite oxidizers (*Nitrospira* and *Nitrobacter* genus respectively), NRK and NRS (nitrite reductase genes), Vmax and Km (kinetic parameters of potential nitrification), DEA (Potential denitrification enzyme activity).

				% variation explained after site effect was removed								
				Response variable	Retained fixed effect	% variation explained by site	% variation explained by fixed effect	proportion of % variation explained by plant traits	proportion of % variation explained by soil parameters	p	Wald Effect	Effect
Microbial abundances	Total microbes	Microbial biomass N	pH							<0.0001	41.01	-0.190
			Total Soil Carbon	59.5	89.8	2.9	97.1	<0.0001	69.22	0.085		
			Specific Leaf Area					0.0012	15.39	-0.020		
	Fungi & Bacteria ratio	Fungi / Bacteria ratio	Total Soil Carbon							0.0039	10.95	-0.003
			Soil DON	97.6	57.1	47.9	52.1	0.0375	5.04	0.017		
			Root Diameter					<0.0001	15.29	-0.190		
	Nitrifiers	AOA	pH							<0.001	30.04	0.500
			Soil NO ₃ ⁻	63.1	78.8	14.6	85.4	0.002	12.99	0.470		
			RDMC					0.0048	10.29	-5.690		
		AOB	NH ₄ ⁺ sorption							<0.001	18.88	0.900
			RDMC	17.7	74.9	28.8	71.2	0.0265	5.95	-3.350		
			Root Length SM					0.0325	5.43	-0.530		
		AOA:AOB ratio	Soil total Nitrogen							<0.001	23.91	-1.270
			NH ₄ ⁺ sorption							<0.001	37.36	0.950
			NO ₃ ⁻ sorption	51.5	74.4	0.0	100.0	0.0013	17.67	-0.120		
	Soil NH ₄ ⁺						0.0164	7.88	0.880			
	NIP	pH							<0.001	20.55	0.428	
		Soil NH ₄ ⁺ : NO ₃ ⁻ ratio	24.3	68.7	0.0	100.0	<0.001	26.63	-0.600			
		NIB	NO ₃ ⁻ sorption							0.023	6.57	0.400
			RDMC	6.9	62.1	11.4	88.6	0.042	4.92	-4.930		
	NIP:NIB ratio	NH ₄ ⁺ sorption							<0.001	19.04	-1.060	
		Leaf C:N ratio	42.1	58.4	24.3	75.7	0.0248	6.22	0.036			
	Denitrifiers	NRK	NH ₄ ⁺ sorption						0.0112	8.18	0.258	
			Root C:N ratio	55.1	74.4	52.7	47.3	<0.001	28.86	0.017		
		NRS	pH	41.7	56.6	0.0	100.0	<0.001	25.59	0.385		
		NRK:NRS ratio	Root C:N ratio	31.3	79.2	100.0	0.0	< 0.001	47.37	94.480		
		Vegetative Height					0.0074	18.93	87.410			
Microbial activities	Nitrification	Vmax	pH						<0.001	63.28	0.300	
			NO ₃ ⁻ sorption	13.3	93.3	0.0	100.0	0.0197	6.93	0.081		
			Soil NH ₄ ⁺ : NO ₃ ⁻ ratio					<0.001	49.75	-0.457		
	Km	pH	25.1	25.0	0.0	100.0	0.0231	5.97	0.248			
	Denitrification	DEA	Total Soil Carbon						<0.001	78.44	0.006	
			Soil NH ₄ ⁺ : NO ₃ ⁻ ratio	30.2	85.0	13.0	87.0	<0.001	26.28	-0.160		
Leaf Carbon Content							0.0008	15.94	-0.006			

Table 2. Fixed effects leaf trait variables retained within the multiple variable REML models for each of the root properties. Also presented is the % variation in each root property explained by the site, the retained fixed effects, and the significance (p), Wald statistic and the direction and magnitude of the standardized effect for each of the retained fixed effects. Legend : Root Length Soil Mass and Root Mass Soil Mass were the root length and root biomass measured per gram of dried soil, C content, N content & DM content were the content of carbon, nitrogen and dry matter in leaves or roots.

	Response variable	Retained fixed effect	% variation explained by site	% variation explained by model (after site effect removed)	p-value	effect	Wald
General root properties	Root Length Soil Mass	Leaf DM Content	56.5	34.0	0.025	2.63	5.88
		Leaf N Content			0.043	-0.02	4.71
	Root Mass Soil Mass	Leaf C Content	66.7	59.0	<0.001	0.54	29.44
		Vegetative Height			0.011	-0.76	14.20
Structural Root Traits	Root Diameter	Vegetative Height	89.1	40.7	< 0.001	0.01	14.91
	Specific Root Length	Leaf C Content	87.0	35.2	0.0023	-0.02	12.14
		Leaf N Content					
	Root Dry Matter Content	Leaf C Content	30.5	39.9	0.003	0.00	14.03
		Leaf N Content			0.045	0.00	4.54
Chemical Root Traits	Root C Content	Leaf C Content	10.6	50.6	< 0.001	1.08	17.25
		Vegetative Height			0.005	-1.66	9.85
	Root N Content	Leaf C Content	4.5	37.3	0.004	-0.08	10.16
	Root C:N ratio	Leaf C Content	2.7	49.3	< 0.001	0.48	17.60

Table 3. Fixed effects of plant trait retained within the multiple variables REML models for each of the microbial properties. Also presented is the % variation in each microbial property explained by fixed effects, the proportion of explanation afforded by the fixed effects due to root traits (chemical or structural) and leaf traits (chemical or structural). Legend: AOA and AOB (ammonium oxidizing archaea and bacteria respectively), NIP and NIB for nitrite oxidizers (*Nitrospira* and *Nitrobacter* respectively), NRK and NRS (nitrite reductase genes), Vmax and Km (kinetic parameters of potential nitrification), DEA (Potential denitrification enzyme activity). RLSM (root length per gram of dried soil), C:N ratio (carbon : nitrogen content ratio), RDMC (root dry matter content).

Response variables			% variation explained by plant traits	Roots traits		Leaves traits	
				chemical	structural	chemical	structural
Microbial Abundances	Total microbes	Microbial biomass N	3.1				SLA
	Fungi & Bacteria	Fungi / Bacteria ratio	47.9		Root Diameter		
	Nitrifiers	AOA	14.6		RDMC		
		AOB	29.9		RDMC (21) RLSM (9)		
		AOA:AOB ratio	0.0				
		NIP	0.0				
		NIB	11.4		RDMC		
		NIP:NIB ratio	24.4			Leaf C:N	
	Denitrifiers	NRK	52.7	Root C:N			
		NRS	0.0				
		NRK:NRS ratio	100.0	Root C:N (75)			Vegetative Height (25)
Microbial Activities	Nitrification	Vmax	0.0				
		Km	0.0				
	Denitrification	DEA	13.0			Leaf Carbon Content	

Appendix 1: Study site characteristics. Data for each soil variables indicate mean values (n=3) followed by standard error (SE).

		Austria Stubai Valley		England Wensleydale in the Yorkshire Dales			French Alps Lautaret		
Location		47° 7' N - 11° 18' E		54°18' N - 2°5' W			45° 4' N - 6°34' E		
Grasslands		Meadow	Abandoned Grassland	Improved meadow	Semi- improved meadow	Unimproved meadow	Fertilized & mown terrace	Unmown terrace	Unmown meadow
Soils / Bed Rocks		Dystric Cambisol soils on Granite Bedrock		Brown-earth soils over limes to neo- carboniferous limestone bedrock			Brown soils with a sandy-loam texture originating from a mixture of colluviums dominated by calshists with eolian material		
Soil Texture	% sand	50.5	31.1	32.1	38.0	47.6	17.4	26.9	23.4
	% clay	13.3	23.4	12.9	13.4	10.9	36.8	28.3	30.0
	% loam	36.2	45.5	55.0	48.5	41.4	45.7	44.7	46.6
Soil pH		5.73 (0.06)	6.41 (0.15)	6.15 (0.26)	6.87 (0.11)	6.24 (0.06)	8.01 (0.03)	8.03 (0.05)	6.31 (0.05)
Soil Carbon (mg. g ⁻¹ soil)		69.98 (4.20)	135.22 (9.9)	68.88 (7.82)	91.34 (7.50)	40.70 (2.74)	90.13 (3.12)	89.96 (7.92)	82.51 (4.12)
Soil NO ₃ ⁻ -N (µg. g ⁻¹ soil)		2.35 (0.71)	0.36 (0.17)	12.36 (1.37)	5.48 (2.33)	0.82 (0.33)	3.87 (0.80)	5.63 (1.28)	2.31 (0.96)
Soil NH ₄ ⁺ :NO ₃ ⁻ ratio		15.02 (8.98)	57.05 (26.29)	0.79 (0.11)	3.87 (2.06)	13.76 (5.26)	3.22 (0.79)	2.92 (0.61)	6.74 (1.81)
Soil N-NH ₄ ⁺ availability (µg. g ⁻¹ resin. d ⁻¹)		1.19 (0.23)	1.79 (0.15)	18.08 (na)	11.20 (0.08)	5.03 (0.85)	0.44 (0.08)	0.48 (0.13)	1.16 (0.31)
Dominant plant species		<i>Trisetum flavescentis</i>	<i>Sesleria Caricetum with dwarf shrubs</i>	<i>Anthoxanthum odoratum, Agrostis capillaris, Sanguisorba officinalis, Plantago lanceolata</i>	<i>Holcus lanatus, Poa trivialis, Lolium perenne, Anthoxanthum odoranthum, Filipendula ulmaria, Ranunculus acris</i>	<i>Alopecurus pratensis, Holcus lanatus, Poa trivialis, Lolium perenne, Ranunculus acris</i>	<i>Dactylis glomerata, Trisetum flavescens, Heradeum sphondylum, Gentiana lutea, Agrostis capillaris</i>	<i>Bromus erectus, Sesleria caerulea, Onobrychis montana</i>	<i>Festuca paniculata</i>

Appendix 2: Results of REML tests of individual soil properties and plant traits as explanatory factors for each microbial properties and functional parameters.

	Microbial biomass N			Fungi / Bacteria ratio			amoA AOA			amoA AOB			AOA:AOB ratio			NIP			NIB			NIP:NIB ratio			NRK			NRS			NRK:NRS ratio			Vmax			KMNEA			DEA					
	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects	P	% variance	effects						
Soil properties																																													
pH	0.041	21.74	-0.16	ns			0.003	30.13	0.576	ns			0.012	20.00	-0.11	0.018	26.87	0.38	ns			0.002	39.34	0.34	0.039	12.50	-0.16	<0.001	56.60	0.385	0.001	40.87	-1101	ns			0.023	25.00	0.25	0.023	20.33	0.14			
apparent bulk density	ns			ns			ns			ns			0.024	18.75	0.42	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			0.024	23.33	-0.57						
total porosity (%)	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
SWC (%)	<0.001	54.57	1.20	0.019	25.81	-0.06	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			0.031	22.22	4034	ns			ns			ns			ns					
WFPS (%)	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			0.012	29.25	0.025	ns			ns			ns			ns			ns			ns					
total soil nitrogen concentration	<0.001	55.00	1.16	0.015	25.81	-0.06	ns			ns			0.050	15.00	-0.37	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			<0.001	47.33	0.81						
total soil carbon concentration	0.014	28.70	0.07	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			0.050	16.981132	0.055	ns			ns			ns			ns			0.004	34.00	0.04			
soil C:N ratio	<0.001	61.52	-0.12	0.040	19.35	0.01	ns			ns			ns			ns			ns			ns			0.031	12.50	-0.08	0.021	22.64	0.12	0.041	12.43	-390.00	ns			ns			ns					
soil NO ₃ ⁻	ns			ns			0.002	36.22	0.703	0.001	41.92	0.53	ns			0.002	39.21	0.59	<0.001	48.90	0.65	ns			ns			ns			ns			<0.001	53.21	0.58	ns			0.002	34.00	0.26			
soil NH ₄ ⁺	0.022	25.43	1.18	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			0.018	16.67	0.81						
soil DON	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
NO ₃ ⁻ availability at peak biomass	ns			ns			0.044	2.56	0.285	0.020	18.56	0.23	ns			0.027	33.04	0.23	0.002	37.89	0.34	ns			ns			ns			ns			0.003	45.51	0.24	ns			0.004	30.00	0.11			
NH ₄ ⁺ availability at peak biomass	0.005	47.39	0.63	0.023	16.13	-0.04	ns			ns			ns			ns			ns			0.001	44.26	-1.10	0.020	29.17	0.52	ns			ns			ns			ns			ns					
NO ₃ ⁻ availability at end of summer	0.045	23.70	0.21	ns			ns			<0.001	54.49	0.48	ns			ns			0.006	55.07	0.49	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
NH ₄ ⁺ availability at end of summer	0.017	33.26	0.47	0.038	12.90	-0.03	ns			0.002	53.29	1.01	ns			<0.001	16.74	0.79	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
soil NH ₄ ⁺ : NO ₃ ⁻ ratio	ns			ns			0.003	33.01	-0.67	0.005	32.34	-0.47	ns			0.004	34.36	-0.55	<0.001	44.05	-0.65	ns			ns			ns			ns			<0.001	43.59	-0.53	ns			0.009	20.00	-0.19			
Plant traits																																													
CWMSLA	<0.001	40.76	-0.04	ns			0.048	14.42	0.07	ns			ns			ns			ns			ns			0.004	33.13	-0.04	ns			0.031	23.35	-141.97	ns			ns			ns					
CWMtable height	0.001	39.64	0.03	0.004	26.06	-0.002	ns			ns			ns			ns			0.05	16.39	-0.03	0.055	14.58	0.02	0.008	29.34	-0.03	0.009	30.54	106.02	ns			ns			ns			ns					
Fdvar SLA	ns			ns			0.053	12.18	-1.75	ns			ns			0.021	24.23	-1.71	ns			ns			ns			ns			0.008	28.85	-1.56	ns			ns			ns					
Fdvar table height	0.003	40.31	0.63	ns			ns			<0.001	-5.95	0.75	ns			ns			ns			ns			0.055	14.58	0.44	<0.001	6.60	-0.88	ns			ns			<0.001	7.14	-0.76	ns			ns		
CWM LNC	ns			ns			ns			ns			0.034	13.75	0.016	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
CWM LCC	0.057	16.70	9.00	0.005	31.60	-0.896	0.002	34.94	-30.93	ns			ns			0.023	25.11	-0.02	ns			0.01	27.87	-0.01	<0.001	57.71	16.44	0.041	14.43	-12.20	0.001	40.18	63.90	0.011	22.44	-16.64	ns			ns					
CWM C/N	ns			ns			ns			ns			0.049	10.63	-0.014	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
Fdvar LNC	0.01	29.18	-0.28	0.027	17.92	0.020	ns			ns			ns			ns			0.05	16.39	0.364	<0.001	48.54	-0.39	0.027	18.96	0.37	<0.001	42.90	-1794.00	ns			ns			ns			ns					
Fdvar LCC	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			0.04	15.63	-0.28	ns			ns			ns			ns			ns					
Fdvar C/N	ns			0.026	19.87	0.178	ns			0.01	20.83	-0.29	ns			ns			0.03	24.67	-4.85	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
CWMLDMC	ns			0.005	31.60	-0.896	ns			ns			ns			ns			ns			0.002	37.92	2.47	ns			ns			ns			ns			ns			ns					
Fdvar LDMC	ns			0.007	27.04	0.022	ns			ns			ns			ns			ns			ns			<0.001	44.58	-0.33	ns			ns			ns			ns			ns					
Root length by soil mass	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			0.033	12.50	0.51	ns			ns			<0.001	26.28	-0.79	ns			ns					
Root biomass by soil mass	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			0.007	27.08	0.02	ns			ns			ns			ns			ns					
RDMC	ns			ns			0.003	35.26	-9.17	ns			ns			0.029	21.15	-6.1	<0.001	35.68	-7.56	ns			0.038	14.58	2.72	ns			ns			0.037	20.51	-4.84	ns			0.041	13.33	-2.18			
Root Diameter	ns			0.016	29.03	-0.16	ns			ns			ns			<0.001	9.25	-1.94	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
SRL	ns			ns			ns			ns			ns			ns			<0.001	2.64	0.63	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
RCC	ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns			ns					
RNC	ns			ns			0.003	33.33	0.21	0.014	23.95	0.133	ns			0.004	33.04	0.18	ns			ns			0.002	39.58	-0.08	0.035	18.87	0.09	<0.001	50.80	-490.00	<0.001	44.87	0.16	ns			0.026	21.00	0.05			
Root C : N ratio	ns			ns			<0.001	41.67	0.04	0.012	25.75	-0.02	ns			0.002	35.68	-0.03	0.025	22.91	-0.3	ns			0.002	39.58	0.02	0.032	18.87	-0.01	<0.001	59.43	104.33	<0.001	46.79	-0.03	ns			0.038	18.33	-0.01			

Conclusion du chapitre 5

Ces deux analyses de mesures sur des dispositifs d'observation *in situ* ont permis d'identifier les traits fonctionnels végétaux impliqués dans les relations avec les paramètres fonctionnels microbiens, et la contribution relative de chacune de ces deux composantes à la fourniture de services écosystémiques par les prairies. Pour obtenir de telles informations, nous avons utilisé une méthode statistique excluant les effets sites dits aléatoires (non expliqués par les variables incluses dans les analyses) pour ne garder que les effets expliqués par ces variables mesurées. Bien que cela ne permette de comprendre qu'une partie de ces processus, nous avons déterminé les relations qui se développent entre les communautés végétales et les autres composantes biotiques et abiotiques de leur environnement, et qui sont communes à plusieurs sites.

Ainsi, nous avons pu explorer l'un des objectifs principaux du projet VITAL dans lequel les travaux de ma thèse se sont inscrits, et qui était de comprendre l'impact des traits fonctionnels végétaux et des paramètres fonctionnels microbiens sur les services des écosystèmes prairiaux. Le premier volet (Grigulis *et al.*, 2013), a donné un éclairage nouveau sur les impacts de ces deux groupes de paramètres biotiques sur le fonctionnement de l'écosystème (quantifié au travers de mesures d'un jeu de propriétés des écosystèmes - EP) et sur les services qui en découlent. De la sorte, nous avons quantifié pour la première fois les effets relatifs des traits fonctionnels végétaux et des paramètres fonctionnels microbiens sur ces EPs. Les traits végétaux contribuaient plus au contrôle de la production de biomasse aérienne qu'aux processus du sol liés à la rétention des nutriments. En effet, les EPs tels que la quantité de biomasse verte ou de litière étaient contrôlés à plus de 80% par les traits fonctionnels végétaux alors que les processus du sol liés au recyclage de l'azote (ex.: lessivage NO_3^-) étaient régulés à plus de 70% par les paramètres fonctionnels microbiens. Bien que les contributions relatives entre ces deux composantes soient différentes, les variables explicatives associées à ces différents EPs suggèrent d'étroites relations entre les espèces végétales dominantes et les communautés microbiennes du sol (Fig. 3 ; Tab. 2 – Grigulis *et al.*, 2013). Cette hypothèse de fonctionnement des écosystèmes qui serait pilotée par l'impact des traits fonctionnels végétaux sur les communautés microbiennes du sol renforce les résultats obtenus dans les chapitres précédents. En effet, les écosystèmes dominés par les communautés végétales exploitatrices (LNC élevée et LDMC bas) et les communautés

bactériennes (rapport F :B faible), notamment nitrifiantes et dénitrifiantes (DEA et Vmax élevées) favoriseront une vitesse élevée du recyclage de l’N, maintenant une forte production de biomasse au risque d’une perte importante d’N par lessivage. A l’inverse, les écosystèmes caractérisés par la dominance d’espèces conservatrices (LNC faible, LDMC élevée) produisant une litière de faible qualité, favoriseront les communautés fongiques du sol (rapport F :B faible), ralentiront le recyclage de l’N et favoriseront sa rétention dans l’écosystème (MBN élevée) (Fig. 1).

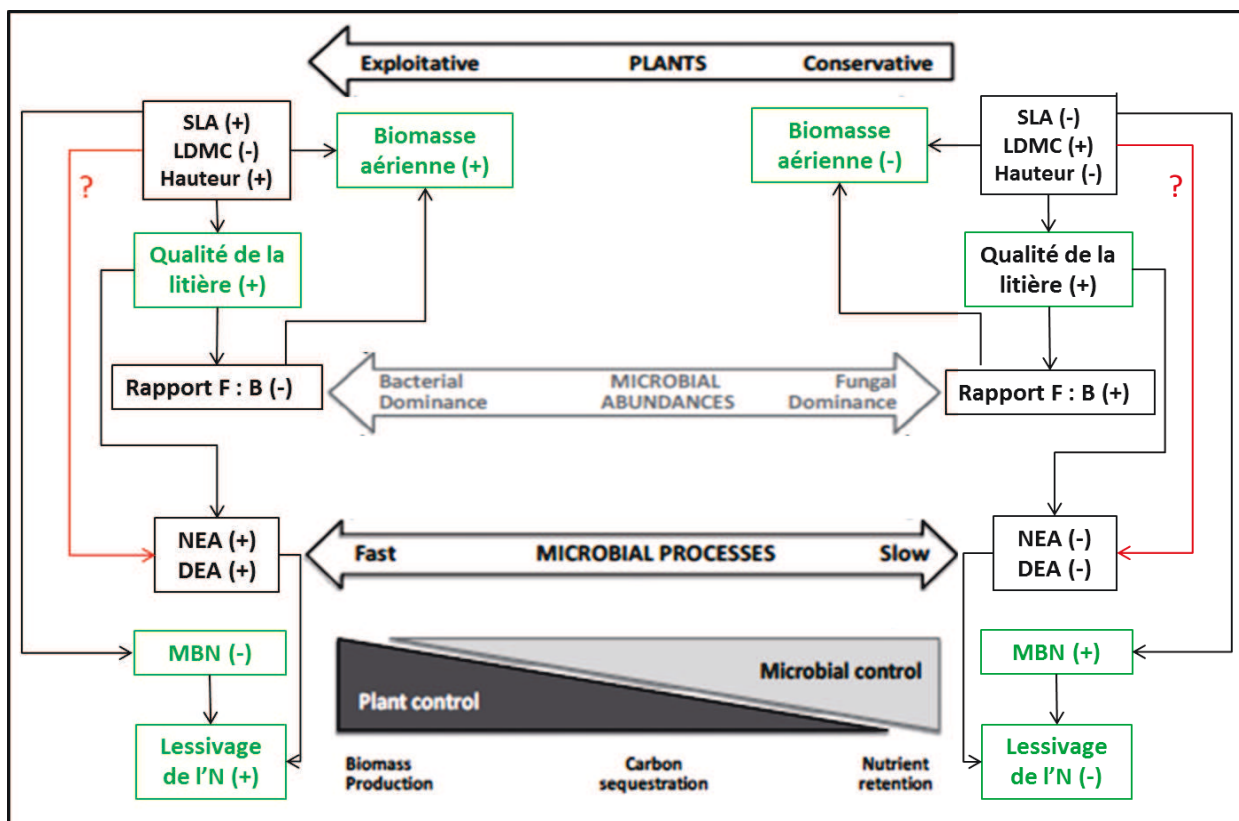


Figure 1. Présentation des liens (flèches noires) démontrés entre les propriétés de l'écosystème (cadres verts) et les traits fonctionnels végétaux ou les paramètres fonctionnels microbiens (cadres noirs) dans l'article de Grigulis *et al.* (2013). Les flèches rouges représentent un lien suggéré entre les traits végétaux et les activités microbiennes nitrifiantes et dénitrifiantes. Légendes : azote (N), surface spécifique foliaire (SLA), teneur en matière sèche (LDMC), rapport champignon : bactérie du sol (Rapport F : B), activités microbiennes nitrifiantes (NEA), activités microbiennes dénitrifiantes (DEA), biomasse microbienne azotée du sol (MBN).

Même s'ils sont suggérés, cette étude n'a pas analysé explicitement de liens directs entre les traits fonctionnels végétaux et les paramètres fonctionnels microbiens, notamment du fait que son objectif était d'abord de déterminer leurs contributions relatives sur une gamme d'EP.

L'étude de ces liens a été réalisée sur ce même jeu de données dans le second article de ce chapitre (Legay *et al.*, soumis à Ecology). Ce travail s'est concentré sur l'influence des traits fonctionnels végétaux, associée à celle des propriétés abiotiques du sol, sur la prédictibilité des paramètres fonctionnels microbiens. Au moyen de la même approche statistique que précédemment, nous avons montré que les propriétés abiotiques du sol étaient, comme attendu, les facteurs majeurs influençant la structure et les fonctions des communautés microbiennes. Bien qu'ils soient impactés par ces propriétés du sol, nous avons aussi montré que les traits fonctionnels végétaux influençaient également directement les paramètres fonctionnels microbiens. L'inclusion de ces traits dans nos modèles statistiques a permis d'augmenter significativement la part de variance des paramètres microbiens expliquée par rapport à des modèles n'incluant que les propriétés du sol. De plus, après avoir vérifié que les traits racinaires et foliaires étaient indépendants les uns des autres, nous avons confirmé l'importance des traits racinaires dans les relations plantes-microorganismes mises en évidence dans les chapitres précédents.

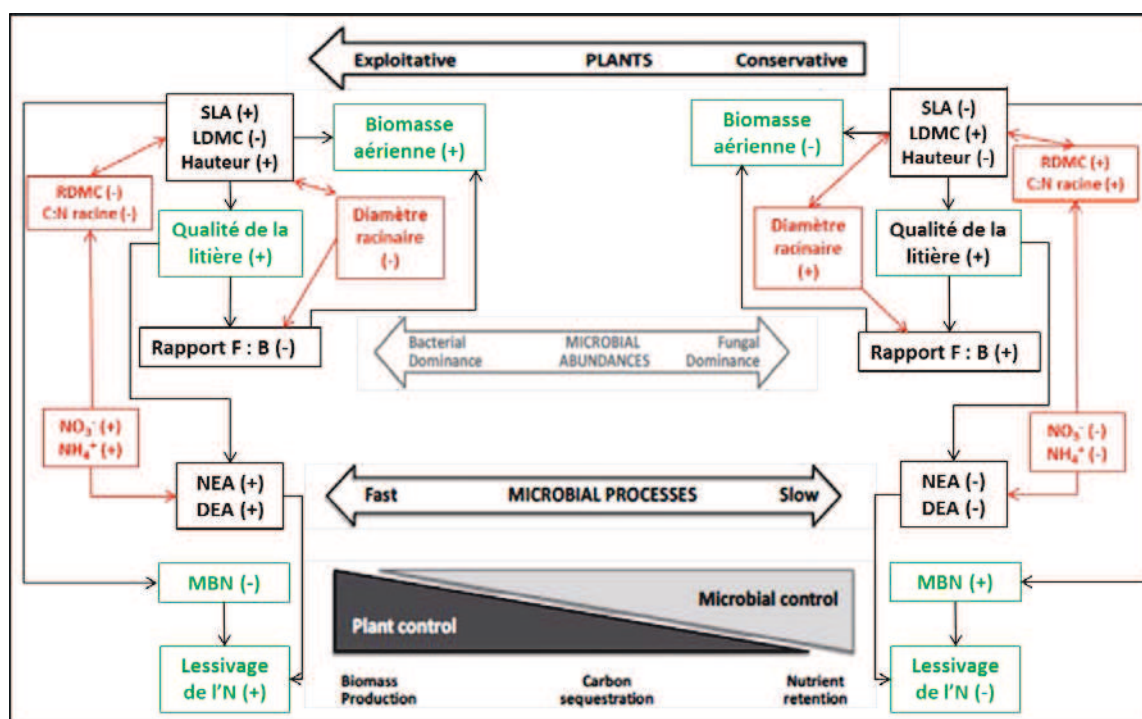


Figure 2. Adaptation du schéma hypothétique proposé dans l'article Grigulis *et al.* (2013). Présentation des liens (flèches noires) démontrés entre les propriétés de l'écosystème (cadres verts) et les traits fonctionnels végétaux ou les paramètres fonctionnels microbiens (cadres noirs). Les flèches rouges représentent les liens et co-variations potentiels (Legay *et al.*, soumis). Légende : azote (N), carbone (C), surface spécifique foliaire (SLA), teneur en matière sèche foliaire (LDMC), teneur en matière sèche racinaire (RDMC), rapport champignon : bactérie du sol (Rapport F : B), activités microbiennes nitrifiantes (NEA), activités microbiennes dénitrifiantes (DEA), biomasse microbienne azotée (MBN).

En effet, même *in situ*, les traits racinaires contribuaient de manière beaucoup plus importante que les traits foliaires aux variations des paramètres fonctionnels microbiens, et notamment dans les proportions relatives de champignons et de bactéries (rapport F :B) et dans l'abondance des gènes microbiens du cycle de l'N.

Les liens des traits végétaux avec le rapport F :B confirment la littérature et montrent, qu'en plus d'un effet indirect via leur litière, les plantes influenceraient directement la composition des communautés microbiennes du sol. Enfin, bien que la part de variance expliquée pour les activités enzymatiques nitrifiantes et dénitrifiantes soit très faible et liée à des traits foliaires, les traits racinaires ont, eux, montré des liens forts avec les gènes microbiens marqueurs des processus de transformation de l'N. Ces liens s'expliqueraient par une co-variation des traits racinaires et des paramètres microbiens en réponse à la disponibilité de l'N.

Ces relations entre traits fonctionnels racinaires et paramètres fonctionnels microbiens démontrées *in situ* confirment donc que les traits racinaires seraient impliqués de manière significative dans les processus écosystémiques du sol (Figure 2).

En effet, dans le chapitre 4, pour les mêmes propriétés des écosystèmes (EP) en mésocosme les traits foliaires impliqués dans les modèles de l'étude de Grigulis *et al.* (2013) n'ont jamais été retenus lorsque les traits racinaires étaient inclus. Cela suggère que l'intégration des traits fonctionnels racinaires améliorerait très probablement l'explication de la variance des EPs du sol dans ces modèles de variations des EP au champ. Une telle analyse intégrant les traits fonctionnels végétaux aériens et souterrains et les paramètres fonctionnels microbiens à l'analyse des variations des EPs reste à réaliser.

Chapitre 6

Etudes des variations saisonnières de l'absorption de l'azote inorganique

Les deux études *in situ* présentées dans le chapitre 5 ont confirmé les résultats mis en évidence en expérimentations contrôlées, à savoir que les fonctions des écosystèmes que nous avons étudiées étaient contrôlées par les propriétés du sol et les traits fonctionnels végétaux et microbiens. Elles ont permis de montrer que les traits fonctionnels végétaux et microbiens étaient de bons indicateurs de la fourniture de services écosystémiques, et que logiquement, les traits végétaux influençaient majoritairement les services « aériens » (quantité et qualité du fourrage et de la litière) alors que les paramètres microbiens exerçaient un contrôle prépondérant sur les services liés au sol (rétention des nutriments). Enfin, nous avons montré que même si les propriétés édaphiques constituaient un facteur majeur influençant les communautés végétales et microbiennes, et donc leurs caractéristiques fonctionnelles, les traits fonctionnels végétaux et notamment racinaires exerçaient également une influence sur les paramètres fonctionnels microbiens. Ainsi, l'utilisation des traits fonctionnels a permis de mieux comprendre le fonctionnement de l'écosystème prairial subalpin et son réseau d'interactions plante-sol.

Les prairies subalpines du Lautaret, où une partie de ces mesures ont été réalisées, sont soumises à une forte variabilité saisonnière qui impacte le fonctionnement de l'écosystème. En effet, dans ces écosystèmes froids, la disponibilité en N inorganique (NH_4^+ , NO_3^-), qui est globalement limitée, varie au cours des saisons et subit un partitionnement entre les plantes et les microorganismes du sol (Jaeger *et al.*, 1999). La compétition pour ces nutriments, essentiels à la croissance végétale et à celle de certaines communautés microbiennes, est très forte, obligeant les organismes à exploiter les différentes formes (NH_4^+ , NO_3^-) de cette ressource (Harrison *et al.*, 2007), ou à utiliser la même forme mais à différentes périodes de l'année. Mesurer l'impact des variations saisonnières sur la dynamique de l'N minéral entre les communautés végétales et microbiennes implique l'utilisation d'un marquage avec un isotope stable, le ^{15}N qui se trouve en quantités naturellement très faibles dans l'environnement en comparaison du ^{14}N qui est beaucoup plus abondant. Cette méthode de traçage de molécules d'azote inorganique enrichies en ^{15}N permet de mieux comprendre et de mieux quantifier la dynamique de l'N inorganique dans l'écosystème à différentes saisons.

La dernier chapitre de ma thèse sera donc consacré aux variations saisonnières à travers une première analyse comparative de la dynamique de l'N minéral à deux périodes

critiques de la saison pour les communautés végétales en utilisant la méthode de traçage isotopique (Legay *et al.* soumis à Biogeosciences). Ces deux périodes sont la fonte des neiges et le pic de biomasse qui correspondent respectivement, à la période de début de croissance des végétaux et à la période de maturation des inflorescences. A ces deux moments critiques, les végétaux ont un besoin important d’N soit pour maximiser leur croissance, soit pour assurer la pérennité de leurs graines en les remplissant de réserves. Cependant, l’N inorganique étant en quantités limitées, les végétaux sont en compétition directe avec les microorganismes. Une précédente étude sur les prairies du Lautaret a mis en évidence que les microorganismes du sol accédaient mieux à l’N inorganique que les plantes au pic de biomasse au début du mois de Juillet (Robson *et al.*, 2010). L’étude que j’ai réalisée s’est donc concentrée sur la dynamique de l’N minéral à la fin de la fonte des neiges, mi-mai. Dans un premier temps, j’ai déterminé qui des communautés végétales ou microbiennes étaient les plus efficaces pour exploiter la ressource disponible à cette période de l’année. Dans un deuxième temps, j’ai étudié l’impact des différents types d’utilisation des terres caractéristiques de ce site sur cette dynamique. Enfin, j’ai comparé mes résultats avec ceux de Robson *et al.* (2010) pour estimer à la fois l’effet des variations saisonnières et de l’utilisation des terres sur l’absorption et le partage des formes d’N inorganique entre les communautés végétales et microbiennes. Les résultats et les conclusions de ces travaux seront présentés dans la première partie de ce chapitre.

La seconde partie présentera les résultats d’une étude consacrée à l’absorption de l’N inorganique chez trois graminées pérennes caractéristiques des prairies subalpines du Lautaret et qui se distinguent par leurs utilisations contrastées des ressources, à savoir *Festuca paniculata*, *Bromus erectus* et *Dactylis glomerata*. Dans cette étude qui est actuellement soumise à Journal of Ecology (Grassein *et al.*, soumis), l’un des objectifs a été de valider l’existence d’un compromis entre exploitation et conservation des ressources à l’échelle de la plante entière (Freschet *et al.*, 2010), à travers la mesure de traits fonctionnels aériens et racinaires de ces espèces. Ensuite, nous avons examiné les liens entre ces traits fonctionnels et les potentiels d’absorption de l’N minéral *in situ* de ces espèces par une méthode de mesure *ex-situ* sur des racines excisées. Enfin, nous avons déterminé les patrons d’absorption de deux formes d’N (NO_3^- et NH_4^+) pour chaque espèce selon les types de prairies où elles sont présentes et pour trois périodes clés de la saison de végétation (début de croissance, pic de biomasse et sénescence).

Article 5

**Effect of land-use on inorganic N uptake by vegetation and soil
microbes at the end of snowmelt in subalpine grasslands –
Comparison with peak biomass data**

**Legay Nicolas, Grassein Fabrice, Robson T.Matthew, Personeni Emmanuelle, Bataillé
Marie-Paule, Lavorel Sandra & Clément Jean-Christophe**

Submitted in *Biogeosciences*

Abstract

Subalpine grasslands are highly seasonal environments and likely subject to strong variability in nitrogen (N) dynamics. Plants and microbes typically compete for N acquisition during the growing season and particularly at plant peak biomass. During snowmelt, plants could potentially benefit from a decrease in competition by microbes because of greater plant N uptake associated with active growth and freeze-thaw cycles restricting microbial growth. In managed subalpine grasslands, we expect these interactions to be influenced by recent changes in agricultural land-use, and associated modifications in plant and microbial communities. At a subalpine grassland site in the Central French Alps, a pulse of ^{15}N was added to the soil at the end of snowmelt, allowing us to compare the dynamics of inorganic N uptake in plants and microbes during this period with that previously reported at the peak biomass in July. In all grasslands, intrinsic plant dissolved inorganic N (DIN) uptake was two to five times greater at snow-melt than at peak biomass, whereas the intrinsic microbial DIN uptakes were similar between the two sampling dates. On an area basis, plant communities took more DIN than microbial communities at the end of snowmelt, and the intensity of this DIN uptake by plants differed across land use types. Consequently, N partitioning after snowmelt switches in favor of plant communities allowing them to maximize their growing capacities. Seasonal differences in microbial and plant N-related dynamics were also affected by past (terraced *vs.* unterraced) rather than current (mown *vs.* unmown) land use. In terraced grasslands, microbial biomass N remained similar across seasons, whereas in unterraced grasslands, microbial biomass N was higher and microbial C:N lower at the end of snowmelt as compared to peak biomass. Further investigations on microbial community composition and their organic N uptake dynamics are required to better understand the decrease in microbial DIN uptake.

Key words: N isotopic tracing, ^{15}N pool dilutions, plant functional groups, snowmelt, land-use, peak biomass, plant N uptake, microbial biomass

1 Introduction

Nutrient availability and the ability to take up nitrogen (N) efficiently are critical plant features in ecosystems (Kaye & Hart 1997; Lipson & Nasholm 2001; Harrison *et al.*, 2008). Plants preferentially absorb inorganic N, though plant organic N uptake has also been demonstrated (Harrison *et al.*, 2007). In contrast, soil microbes, depending on their turn-over status, can be considered as N sinks or sources for dissolved organic (e.g. amino acids) and inorganic N (e.g. nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+)) in soils. This means that plant N uptake must operate in a dynamic relationship with that of soil microbes, which can both compete for and produce N forms (Schmidt *et al.*, 2007; Van der Heijden *et al.*, 2008). Such dynamics are particularly critical in cold ecosystems (e.g. tundra and alpine meadows), which are characterized by slow N mineralization rates (Bardgett *et al.*, 2007). In alpine ecosystems, soil microbes are strongly influenced by environmental conditions and particularly seasonal variability (Mancinelli, 1984). Microbial pool size fluctuates during repeated freeze-thaw cycles (Schimel & Klein, 1996) and soil microbial activities and phylogenetic composition change significantly over such short time scales (Baptist *et al.*, 2008). These freeze-thaw cycles can lead to a microbial crash, a drastic decrease in microbial biomass (Jaeger *et al.*, 1999), or induce microbial quiescence which is a dormant state in stressful environments (Malik & Smith, 2006). Such seasonal variability can influence plant-microbe relationships, affecting plant N uptake, microbial activities, and the composition and biomass of microbial communities. It is well known that plants and microbes are competing for N acquisition mainly during the growing season and particularly during the peak of plant productivity. For instance, Bardgett *et al.* (2002) showed that, early in the growing season in May, the dominant graminoid on a mountain plateau obtained N either from stored reserves or from uptake through its active roots over the winter. By June, this plant switched to N that was surplus to microbial requirements as mineralization rates increased in parallel with above-ground growth and soil N concentrations. At Niwot Ridge, an alpine environment, Jaeger *et al.* (1999) explained seasonal variations in microbial N immobilization by freeze-thaw cycles which restricted microbial growth. Such seasonal shifts in plant-microbe relationships are suspected to have important repercussions on nutrient cycling and ecosystem functioning (Lipson & Nasholm, 2001). As yet, evidence for this dynamics is largely limited to alpine and high-latitude ecosystems; however it could occur in a broader array of cold ecosystems, including subalpine grasslands where climatic conditions are slightly more

favorable for plant growth with a longer growing season and higher mean temperatures, but more freeze-thaw events (Saccone *et al.*, 2013).

In subalpine grasslands, like in many terrestrial ecosystems (Kaye & Hart, 1997), N is the most limiting nutrient to the net primary productivity, and therefore also limits other trophic levels. N inputs are low (from N fixation, snow or atmospheric depositions) when human activities are absent or limited (Clément *et al.*, 2012). This limitation might be reinforced in subalpine grasslands since the mineralization rate of soil organic matter is severely constrained by climatic conditions (Saccone *et al.*, 2013). In managed grasslands, interactions among plants and microbes, and their implications for nutrient cycling are also influenced by current and past human activities (Steenwerth *et al.*, 2000; Robson *et al.*, 2007; Strickland *et al.*, 2010). In European mountains, including the French Alps, agricultural management has often converted naturally forested landscapes to terraced crops and semi-natural grasslands (Girel *et al.*, 2010). Today, landscapes include a diversity of grassland communities whose botanical and functional composition depend on past (terraced *vs.* untterraced) and current (manuring, mowing) land use (Quétier *et al.*, 2007). Since the 1950s, decreased management intensity has strongly affected ecosystem functioning by changing plant-community functional composition towards more conservative nutrient use strategies, particularly tussock grasses (Quétier *et al.*, 2007), thereby impacting ecosystem services such as grassland agronomic and cultural values (Lavorel *et al.*, 2011; Schirpke *et al.*, 2012). These functional changes also include decreased N availability and net N mineralization (Robson *et al.*, 2007), with a parallel decrease in microbial activities, and an increase in soil C:N ratio and fungal:bacteria ratio (Zeller *et al.*, 2000; Robson *et al.*, 2007). Such a decrease in soil N availability could interfere with seasonal patterns of interactions between plant and microbial communities for the acquisition of this limiting resource.

Our study was conducted in the Lautaret Pass area (Central French Alps) where previous studies have shown that traditional grasslands management including mowing and manuring increased plant-available N and soil N pools during the growing season (June-August) (Robson *et al.*, 2007). A previous isotopic pool-dilution experiment during peak biomass and flowering (July 2005) suggested that in more intensively-managed grasslands plants exerted a greater control over N cycling than microorganisms, and that a greater N uptake by plants and microbes stimulated soil N availability, allowing nutrients to be more

readily returned to the soil (Robson *et al.*, 2010). Yet, the literature on N cycling in mountain ecosystems describes the snowmelt period as a “key moment” for the overall yearly N budget and in the partitioning of N resources between plants and microbes (Jaeger *et al.*, 1999; Bardgett *et al.*, 2005). Therefore, the main objective of our study was to determine whether the dynamics of N uptake between plants and microbes at the end of snowmelt was comparable with that reported at peak biomass by Robson *et al.* (2010). We hypothesized that seasonal N partitioning was due to a decrease in microbial activities (e.g. N uptake) at the end of snowmelt which allowed plants to fulfill most of their N needs in the meantime, and thus changed the dynamics of N fluxes. To determine whether this seasonal N partitioning occurred and differed across land use types, we quantified the N pools and fluxes for microbial, plants and soil compartments with ^{15}N labeling just after snowmelt. We anticipated higher rates of N uptake by plants in comparison to microbes, and a change in the N dynamics when compared to the summer (Robson *et al.*, 2010). We also expected that more intensively managed plant communities dominated by fast-growing species would benefit from microbial quiescence (Malik & Smith, 2006) to take up more N than at peak biomass, whereas less intensively managed communities dominated by slow-growing, conservative plant species would maintain the same N uptake rate throughout the growing season.

2 Materials and methods

The field site is located in the central French Alps between the village of Villar d'Arène and the Lautaret Pass (45°02'N. 6°20'E. 1650-2000m a.s.l.). The climate is subalpine with a strong continental influence. The annual precipitation in 2010 was 954 mm. Winters are cold and snowy with a mean temperature of -6.5°C in February, whereas summers are dry with a mean temperature of 13.9°C in July. The growing season begins during snowmelt usually in early May and continues until late September.

We studied twelve grasslands, representing four combinations of past (terraced *vs.* unterraced) and present (mown *vs.* unmown) land uses (Quétier *et al.*, 2007) (three replicates for each combination). Two types of grasslands were on terraced slopes, (i) one was mown for hay in early July (Mown Terraced, MT), (ii) and the second was never mown but lightly grazed in early July (Unmown Terraced, UT). Unterraced grasslands were either still currently mown in early August (Mown Unterraced, MU) or only very lightly grazed during the seasonal migration of livestock to summer pastures (Unmown Unterraced, UU). Their abiotic characteristics and plant communities are described in detail in Quétier, Thébaud & Lavorel (2007), and management has been stable at least since measurements began in 2003. The same grassland fields were studied using the exact same isotope labeling protocol during summer 2005 (Robson *et al.*, 2010).

We made a pool dilution experiment by inoculating all fields with ^{15}N in order to understand N competition at the end of the snowmelt period on 17th and 18th May 2010. The soil was inoculated with a solution of ammonium nitrate ($\text{NH}_4^+ \text{NO}_3^-$) 98% dual-labeled with ^{15}N to allow a homogenous supply (monitoring) of N between soil, plants and microbes. A concentration of either 1.2 (MT and UT field types) or 0.8 g.m^{-2} (MU and UU field types) of ^{15}N (6.42 $\mu\text{g N g}^{-1}$ soil for each fields) was chosen, equivalent of c. 10% of the maximum $\text{NH}_4^+ \text{NO}_3^-$ pool (0-10cm) at the site. 100 ml of labeled $^{15}\text{NH}_4^+ \text{ }^{15}\text{NO}_3^-$ solution was injected across three 40 x 20 cm areas within each of the 12 fields. A 4 ml volume was injected into the soil at 0-5 cm depth, spaced 2 cm apart over the delimited area. An alloy nail slightly wider than the syringe needle was used to make a conduit for the needle to enter the soil. Plant biomass and soil cores were sampled prior to inoculation to obtain zero-time-control ^{15}N natural abundance measurements. Following inoculation, a time course of ^{15}N remaining in the $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ pools was obtained from samples taken after 48h and 1 week. A sample of aboveground biomass was harvested from 200 cm^2 of each inoculated area (three subplots) in

252

all 12 fields, allowing a border to avoid any edge effect. Two soil cores of 4.5-cm diameter were removed and fresh weight obtained from all three subplots, in the same place as the biomass harvest. One core was used for soil analyses and the other one for root analyses.

Cores for root analyses were carefully dissolved in tepid water and roots were separated by floatation, weighed fresh, then dried (70°C, 72h) and reweighed. Root cores were weighed before root separation to allow calculation of root density.

Cores for soil analyses were kept on ice in the field and maintained at 4°C upon return to the laboratory (within 2h). Soil was passed through a 5.6-mm sieve to remove roots and stones, to avoid any nitrogen mineralization flush by soil microbes when a mesh of 2 mm is used (Jones & Willet, 2006), and to determine soil density. Two 10 g samples of fresh, sieved soil were subsampled, one for K₂SO₄ (0.5M) extraction of mineral N, and the other one for chloroform fumigation and subsequent K₂SO₄ (0.5M) extraction to quantify microbial N. Chloroform fumigation was performed for 7 days (Brookes *et al.*, 1985). Subsamples of 10 g of sieved soil were shaken mechanically in 50 ml of K₂SO₄ (0.5 M) for 1h at 250 rpm. NH₄⁺ and NO₃⁻ were each removed from the K₂SO₄ solution using acid-trap diffusion extraction (Stark & Hart, 1996), and prepared for mass spectrometry to determine ¹⁴N and ¹⁵N concentrations of these two N forms. Soil microbial N concentration were calculated as the sum of NH₄⁺ and NO₃⁻ from unfumigated soil subtracted from total mineral N from the fumigated soil (NO₃⁻ plus NH₄⁺). The ¹⁴N and ¹⁵N contents were estimated for all samples using a direct-combustion mass spectrometer (IRMS, Isoprime, Elementar). A subsample of K₂SO₄ soil extracts were analysed by colorimetry (Fiastar 5012 Flow Injection Analyser, Foss Tecator AB, Sweden, following Bowman, Bahnj & Damm (2003), to provide estimates of NH₄⁺ and NO₃⁻ concentrations for the mass spectrometry samples.

Aboveground biomass was dried at 65°C and weighed to calculate the relative growth rate (RGR) at the community level between each sampling date, and a subsample of green leaf material from non-senescent leaves was removed and ground for ¹⁵N analysis by mass spectrometry.

Data analysis:

All biochemical analyses were performed on pooled samples from three subplots in each field, and replicated across three fields for each land use.

The estimation of the daily ^{15}N uptake rate from the soil pool by each compartment (plants and microbes) was calculated using the relative proportion of the added ^{15}N remaining in the soil and in the other compartments over the period from incubation until each sampling date, following the equation described in Stark (2000):

$$(\text{MAB} = (\text{PBt} \cdot \text{IBt}) / ((\text{IA}_0 \cdot (1 - e^{-k})) / k)$$

where $k = \ln(\text{IA}_0 / \text{IA}_t) / t$. MAB is the total amount of nutrient (added plus natural isotopes) that flowed from the source pool (A) to the sink pool (B) during the incubation; PBt is the concentration of B (sink pool) at the end of incubation; IBt the relative amount of isotope, in excess, that is found in pool B at the end of the incubation; IA_0 is the relative amount, in excess, that is present in the source pool at the beginning of the incubation; IA_t is the relative amount of isotope, in excess, that is present in the source pool at the end of the incubation; and t is the length of the incubation time.

Gross N production and consumption rates for NH_4^+ and NO_3^- were calculated using the isotope dilution equations from Kirkham & Bartholomew (1954)[in Stark (2000)]:

$$\text{Gross production rate (GPR)} = [(P_0 - P_t) / t] \times [\log(I_0 / I_t) / \log(P_0 / P_t)]$$

$$\text{Gross consumption rate (GCR)} = \text{GPR} - [(P_t - P_0) / t]$$

Where P_0 and P_t are the nutrient concentrations at the beginning and at the end of the incubation respectively; I_0 and I_t are the relative amounts, in excess, that are present in the nutrient pool at the beginning and at the end of the incubation (atom % excess) respectively; and t is the length of the incubation time.

To minimize errors during calculation of N fluxes, we used the 48h sampling time, assuming that labeled N added to the soil could cycle quickly between microbial and plant N pools. This duration was also chosen in July 2005 to calculate N fluxes and will therefore allow a comparison between the two dates for our experiments. This comparison should be considered with care since inter-annual variability probably added to seasonal variability. Yet, we argue that, even though both sampling sessions did not occur within the same year, they were

contrasted enough (i.e. the end of the snow melt in May 2010 vs. the peak of above-ground biomass in July 2005) to be considered as different seasons and to observe drastically different ecosystem functioning and N cycling. Further, there were no extreme climatic events over the intervening period, and both 2005 and 2010 could be considered as within the range of average climate conditions.

In all grasslands studied at the end of snowmelt, the effects of past (terraced vs. unterraced) and current (mown vs. unmown) land use on biomass, N concentration and N flux in each compartment were tested using a two-way ANOVA. A Tukey's Studentized Range (HSD - Honest Significant Differences) test was used to examine *a posteriori* differences among land use means. Using raw dataset from Robson *et al.* (2010), the effect of time (end of snowmelt vs. peak biomass), past and current land-use were also tested with a three-way ANOVA. Finally, to investigate seasonal variations, a Kruskal-Wallis test of pair-wise comparisons across land use types was used to test whether there was evidence for seasonal variations between May and July. Where necessary, data were transformed to better comply with the criteria of normality and homoscedasticity required for analyses. All analyses were performed in JMP 7.0 (SAS Institute, Cary NC).

3 Results

3.1 Nitrogen dynamics after snowmelt

3.1.1 Plant biomass and growth

At the beginning of the growing season, while above-ground biomass was the greatest in the terraced grasslands, plant RGR over one week was greater for terraced grasslands indicating higher biomass production (Table 1). In contrast, there were no effects of current management (mowing) (Table 1). Root density was influenced by past land use and by the interaction of past and current land use since root density was greater in unt terraced than in terraced grasslands, and greater in mown than in unmown terraces (Table 1) (see also Appendix C1).

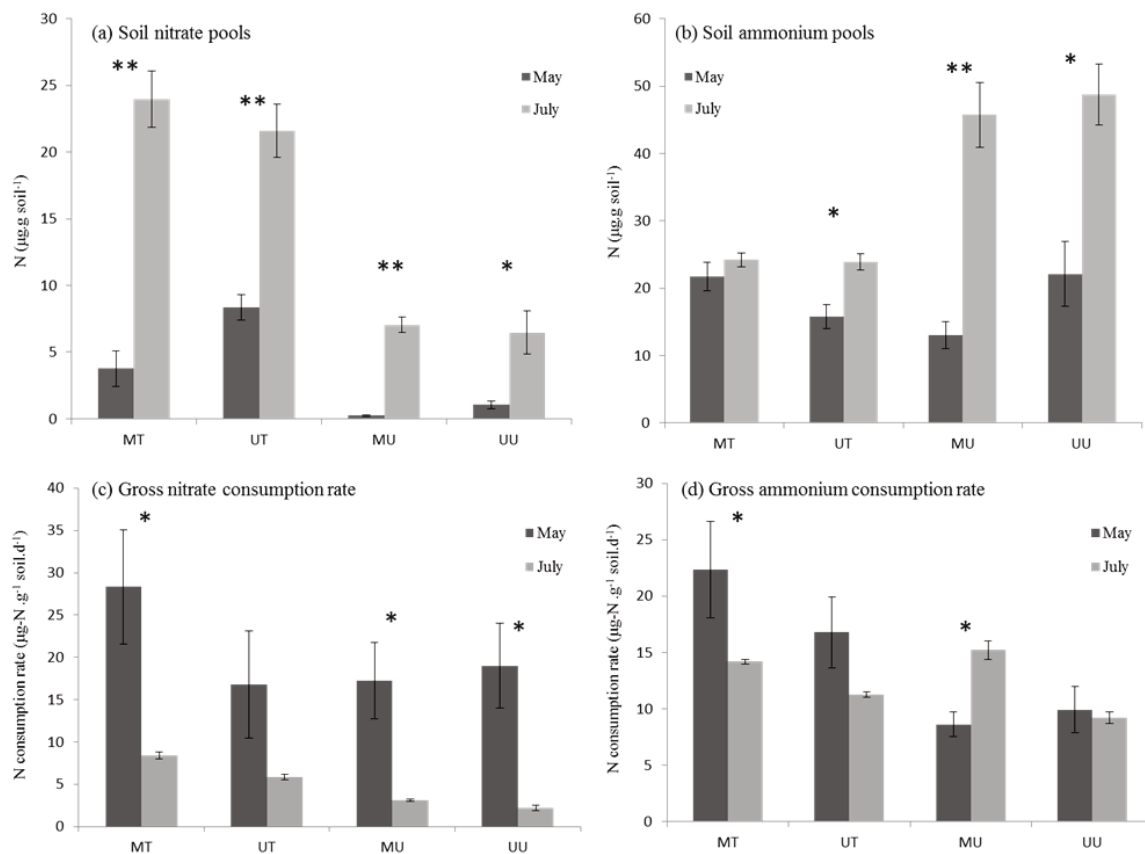


Figure 1. Soil inorganic nitrogen (N) pools and fluxes at the end of snowmelt (May 2010) and at the peak biomass (July 2005). (a) Soil N-NO₃⁻ and (b) N-NH₄⁺ available at the beginning of both experiments is calculated from N concentration for each g of soil. (c) Soil N-NO₃⁻ and (d) N-NH₄⁺ flux per day using the ¹⁵N pool dilutions for 48 h after inoculation from the isotope dilution equations of Kirkham and Bartholomew. Data from four 200-cm² areas per fields were amalgamated to give mean values of three fields per land use ± 1SE. Statistical analysis were done separately for each land use and stars represent significant differences (*<0.05;

<0.01 and *<0.001). Treatment code: Mown Terraced (MT), Unmown Terraced (UT), Mown Unterraced (MU) and Unmown Unterraced (UU).

3.1.2 Soil, microbial and plant N pools

Soil N-NO₃⁻ concentration differed according to land use and the differences were consistent whether expressed per soil mass or per soil area (Table 1). Soil N-NO₃⁻ concentration was higher in terraced than in untterraced grasslands, and highest in the UT fields among the terraced grasslands (Table 1). Soil N-NH₄⁺ concentration was only influenced by the interaction of past and current land use since UU fields had the highest soil N-NH₄⁺ concentrations, and MU fields the lowest (Table 1). Past and current land use had an effect on soil N-NH₄⁺/N-NO₃⁻ ratio, with a greater prevalence of N-NH₄⁺ in untterraced than in terraced grasslands; the ratio was smaller in unmown fields in both cases (Table 1). Land use had no effect on microbial biomass N (MBN) but there were significant differences for the microbial C:N ratio, with greater values in terraced than in untterraced grasslands (Table 1).

Total above-ground N concentration per g of biomass did not vary with land use. Because of higher plant biomass (per area), the above-ground N concentration varied between terraced and untterraced grassland (Table 1), and was higher in the UU fields than MT fields (Table 1). Root N concentration did not change with land use on a field area basis (Table 1). Conversely, root N concentration (per g of biomass) was greater in the terraces than in untterraced grasslands (Table 1) (see also Appendix C1).

3.1.3 Plant and microbial N uptake

Specific root N uptake differed between land uses with a greater uptake in terraced than in untterraced grasslands, and a differential effect of mowing dependent on past land use (Table 1). Specific root N uptake was greater in UT fields, intermediate in mown fields, and lower in UU fields. Aboveground N translocation (by area) was influenced by past land use and was higher in terraced than in the untterraced grasslands (Table 1), and per g of above-ground biomass differed for UU fields compared to rest of the fields (Table 1). Specific (per g of biomass) and gross (per area) microbial N uptakes did not differ across land uses (Table 1).

Consumption rates of N-NO₃⁻ both per g of soil or per area never differed among land use types, while the N-NH₄⁺ consumption was affected by past land use with higher rates in the terraced than untterraced grasslands (Table 1) (see also Appendix C2).

3.2 Seasonal effect on N dynamics

We acknowledge that inter-annual variability probably added to seasonal variability in our comparison. Nevertheless, both sampling sessions were contrasted enough (i.e. the end of the snow melt in May 2010 vs. the peak of above-ground biomass in July 2005) to be considered as different seasons and to observe drastically different ecosystem functioning and N cycling. This comparison offers an opportunity to unravel the temporal variability in the resource (N) competition between plant and microbes in subalpine grasslands.

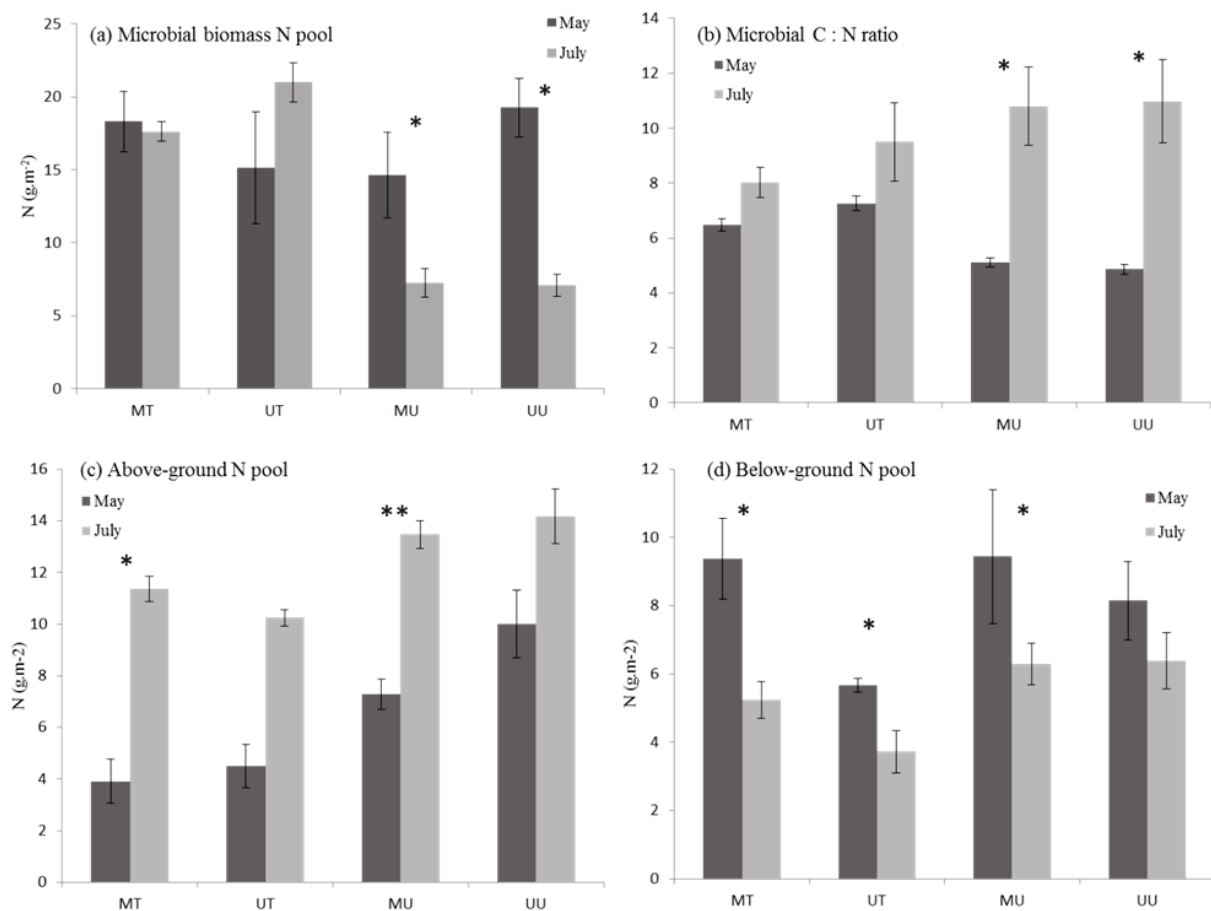


Figure 2. Microbial and plant nitrogen (N) pools at the end of snowmelt (May 2010) and at the peak biomass (July 2005). (a) Microbial N pool and (b) microbial C:N ratio at the beginning of both experiments is calculated from the microbial N concentration x biomass per m⁻². (c) Above-ground N and (d) root N pools at the beginning of the both experiments are calculated from leaf or root N concentration x biomass per m⁻². Data from four 200-cm² areas per fields were amalgamated to give mean values of three fields per land use \pm 1SE. Statistical analysis were done separately for each land use and stars represent significant differences (* <0.05 ; ** <0.01 and *** <0.001). Treatment code: Mown Terraced (MT), Unmown Terraced (UT), Mown Unterraced (MU) and Unmown Unterraced (UU).

3.2.1 Variation in N pools

Inorganic N availability in soil varied between the peak biomass (July 2005) and the beginning of the growing season which begun at the end of snowmelt (May 2010). We observed large differences in soil N-NO_3^- concentration which was always greater at peak biomass than at the end of snowmelt (Table 2; Figure 1a). Variation in soil N-NH_4^+ concentration showed a different pattern with much smaller but significant differences between the two dates (Table 2). Past and current land uses also influenced soil N-NH_4^+ concentration with lower values in untterraced than in terraced grasslands ($F=21.57$; $p < 0.001$); while no difference between the two sampling dates was observed in MT fields (Figure 1b and Table 2).

There were large differences in soil N-NO_3^- consumption rate between the two sampling dates, with higher values in May for all fields ($F= 72.15$; $p < 0.001$), even if a past land use effect was observed with no difference in UT fields (Figure 1c and Table 2). The consumption rates of N-NH_4^+ followed a different pattern depending on past land use ($F= 12.69$; $p < 0.05$): they were larger in May 2010 only for MT fields; whereas they were higher in July 2005 for UM fields (Figure 1d and Table 2).

Other soil parameters (e.g. pH, soil C/N ratio and bulk density - data not shown) did not differ much across the two sampling dates. Only soil total N concentration was lower in May 2010 for all grasslands due to concomitant decreases of N-NO_3^- and N-NH_4^+ concentrations in soil and a greater consumption rate of these both N forms than in July 2005.

Microbial biomass N differed between the two sampling dates depending on past land-use ($F= 17.29$; $p < 0.001$). In the terraces, microbial N pools were not different between the two sampling dates, whereas MBN strongly decreased in July for untterraced grasslands (Figure 2a and Table 2). This effect of sampling date was reflected in microbial C:N ratio ($F=61.15$; $p < 0.001$) with no variations in the terraced grasslands, while C:N ratio was twice as high in July 2005 than in May 2010 for both untterraced grasslands (Figure 2b and Table 2).

There was no difference in above-ground plant N per g of biomass between the two sampling dates (Table 2), whatever the land-use. A slight effect of sampling date was observed in root N concentrations per g of biomass ($F=5.05$; $p < 0.05$) since N concentrations were higher at the end of snowmelt than at peak biomass only in terraced grasslands ($F=5.86$; $p < 0.05$). However, when expressed per area, a strong effect of sampling date was observed in aboveground N contents and root N contents (Figure 2c, 2d and Table2).

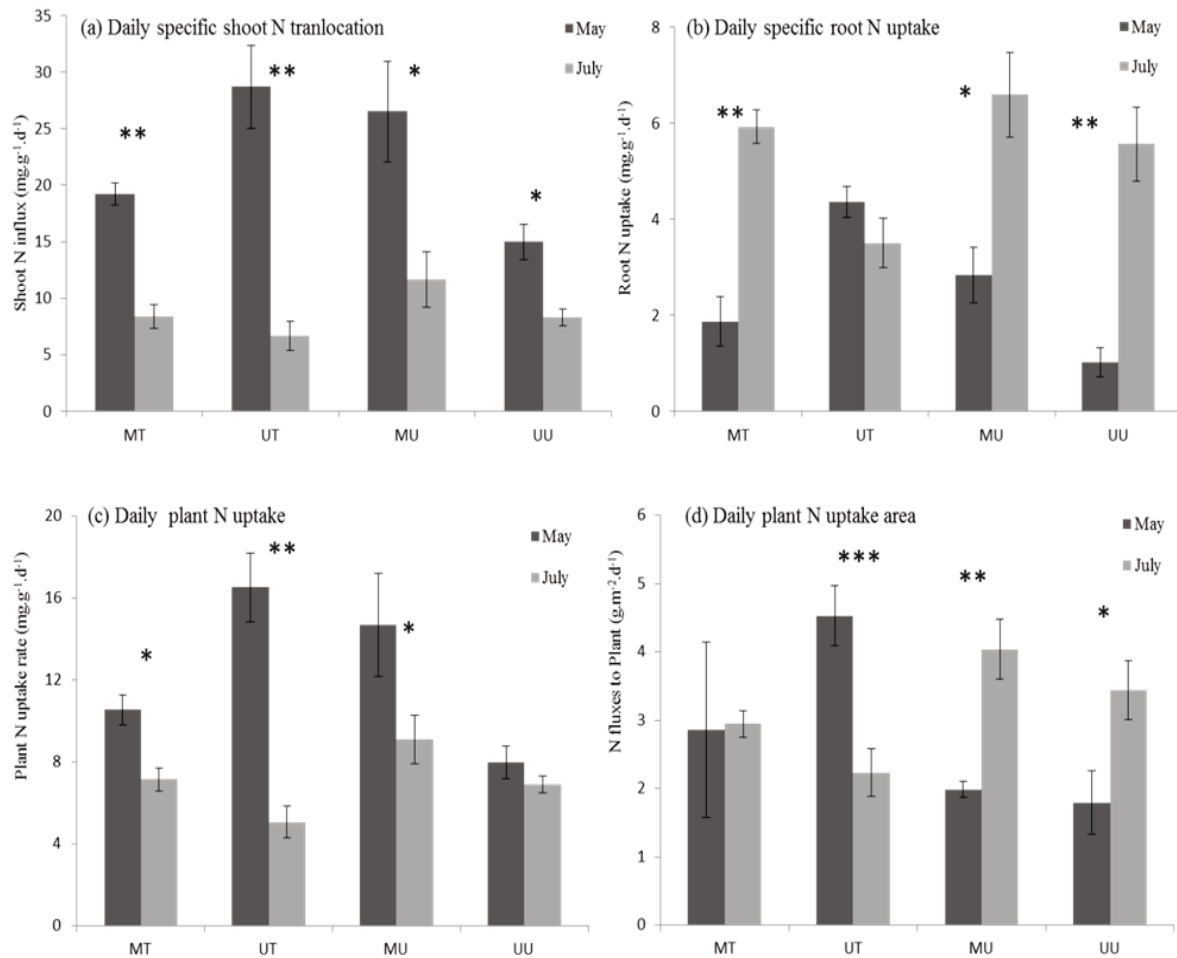


Figure 3. Plant nitrogen (N) fluxes at the end of snowmelt (May 2010) and at the peak biomass (July 2005). The flux of nitrogen (N) into (a) above-ground plant tissue, (b) below-ground plant tissue on a per g-biomass basis. The flux of N into the entire plant per day (c) on a per g-biomass basis and (d) on a per-area basis. Uptake of N is calculated from the ¹⁵N concentration and the soil ¹⁴N : ¹⁵N ratio. Data from four 200-cm² areas per fields were amalgamated to give mean values of three fields per land use \pm 1 SE. Statistical analysis were done separately for each land use and stars represent significant differences (* <0.05 ; ** <0.01 and *** <0.001). Treatment code: Mown Terraced (MT), Unmown Terraced (UT), Mown Unterraced (MU) and Unmown Unterraced (UU).

3.2.2 Variations in daily N uptake

In all grasslands, shoot N translocation differed between May 2010 and July 2005 ($F=106.58$; $p < 0.05$). Shoot N translocation was higher at the end of snowmelt in all grasslands even if rates differed between land-uses (Figure 3a and Table 2). A greater biomass at peak biomass in July partially compensated for the stronger N translocation per g to shoot in May, resulting

in similar N translocation per area between May and July (Table 2). Root N uptake per g of biomass varied between the two sampling dates ($F=51.74$; $p < 0.001$) and showed different effects depending on land-uses ($F=12.72$; $p < 0.01$). Root N uptake was higher at peak biomass in all untterraced grasslands ($F=10.16$; $p < 0.01$) and MT fields, however no difference was apparent in UT fields (Figure 3b and Table 2). When expressed on a field area basis, root N uptake was greater in July 2005 only in untterraced grasslands ($F=17.65$; $p < 0.001$; Table 2). When shoot and root N uptakes were taken together, overall plant N uptake rate per g of biomass differed between the two sampling dates ($F= 46.68$; $p < 0.001$) and between the land-uses. Plant N uptake was higher in May 2010 than in July 2005 in all terraced grasslands ($F=9.33$; $p < 0.01$) and in the mown terraced grasslands (Figure 3c and Table 2). A contrasting pattern was evident per area as there were some interactions between land-use and plant N uptake ($F=5.45$; $p < 0.05$), which was higher in July 2005 in all untterraced grasslands ($F=20.16$; $p < 0.001$). In the terraced grasslands, plant N uptake did not differ in MT fields between the two sampling dates, but it was higher in UT fields at the end of snowmelt (Figure 3d and Table 2). Specific microbial N uptake (per g of microbial biomass) showed no significant variations between the two sampling dates (Figure 4a and Table 2), but these results confirm that the existing differences in microbial N uptake between terraced and untterraced grasslands at peak biomass had disappeared by the end of snowmelt ($F=10.85$; $p < 0.01$). Gross microbial N uptake (per area) followed a different pattern between the two sampling date ($F=120.32$; $p < 0.001$), it strongly decreased at the end of snowmelt in all grasslands with most contrasting differences in terraced than in untterraced grasslands (Figure 4b and Table 2).

Finally, we observed a switch in the importance of microbial and plant N uptake, since, on an area basis, plants were the strongest sink for inorganic N at the end of the snowmelt ($F=11.01$; $p < 0.01$) whereas microbes dominated N uptake at peak biomass (Figure 4c, 4d). However, these patterns were also influenced by land-uses, and in different ways at the two sampling dates. At peak biomass (i.e., July 2005; Fig. 4d), microbes dominated daily N uptake in terraced grasslands but not in untterraced grasslands ($F=45.16$; $p < 0.001$). Whereas, no clear pattern was observed at the end of snowmelt (i.e., May 2010; Fig. 4c), even if plant and microbial N uptake showed some variations with land-use: plants took up more inorganic N than microbes in the UT and MU fields, whereas no differences in N uptake were observed in two others grasslands ($F=7.43$; $p < 0.05$).

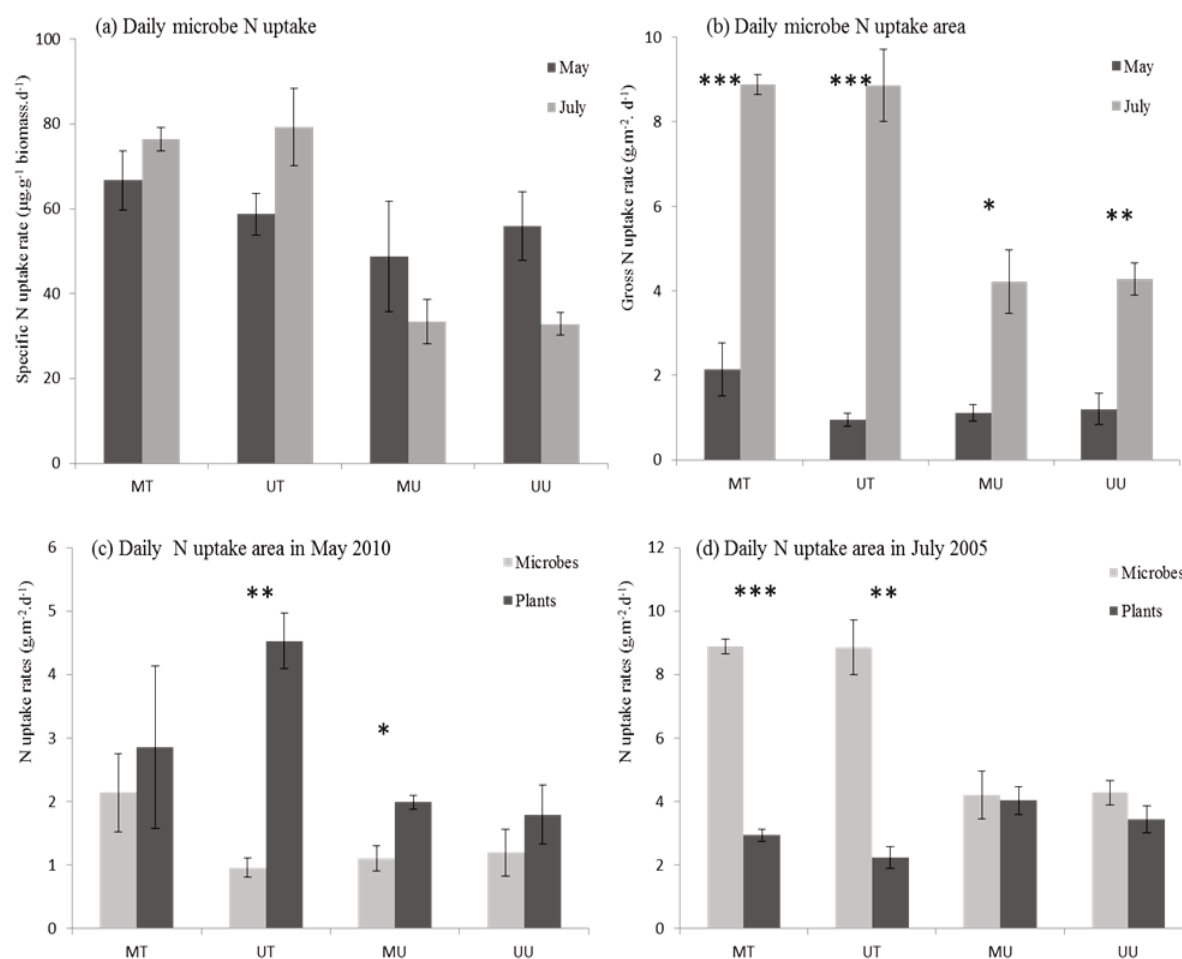


Figure 4. Microbial and plant nitrogen (N) fluxes at the end of snowmelt (May 2010) and at the peak biomass (July 2005). The flux of nitrogen (N) into microbial biomass per day (a) on per g-biomass basis and (b) on per-area basis. The flux of nitrogen (N) into plant and microbes in (c) May 2010 and (d) in July 2005. Uptake of N is calculated from the ^{15}N concentration and the soil $^{14}\text{N} : ^{15}\text{N}$ ratio. Data from four 200-cm^2 areas per fields were amalgamated to give mean values of three fields per land use $\pm 1\text{SE}$. Statistical analysis were done separately for each land use and stars represent significant differences (* <0.05 ; ** <0.01 and *** <0.001). Treatment code: Mown Terraced (MT), Unmown Terraced (UT), Mown Unterraced (MU) and Unmown Unterraced (UU).

4 Discussion

Our results revealed that inorganic N uptake patterns for plant and microbial communities in subalpine grasslands differed markedly between the end of snowmelt and those previously documented at peak vegetation (Robson *et al.*, 2010). No difference in specific microbial N uptake (per g of microbial biomass) was apparent between the two sampling dates, though gross microbial uptake (per area) was much lower in May 2010 than in July 2005 in all grasslands studied. The contrasting plant communities did not benefit in the same way from this microbial quiescence. In line with our expectations, plant communities on terraced grasslands took up more inorganic N at the end of snowmelt than at peak biomass, whereas plant communities in untterraced grasslands maintained similar inorganic N uptake rates between the two sampling dates (Fig. 5).

4.1 N pools variations across season and land-uses

Nutrient availability and the ability to take up inorganic N efficiently are critical plant features in arctic and alpine ecosystems characterized by slow N mineralization rates (Bardgett *et al.*, 2007). After a long period of snow cover and low temperatures, rising daily temperatures allow snowmelt that increases soil moisture and consequently nutrient availability (Brooks *et al.*, 1998; Clément *et al.*, 2012; Saccone *et al.*, 2013). Nevertheless, in our study, soil N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺ pools at the end of snowmelt were much lower than at peak biomass, and this decrease of soil DIN was much stronger in untterraced than in terraced grasslands. Although some studies in cold ecosystems have reported a similar reduction in inorganic N pools during or at the end of snowmelt (Brooks *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 2006), these results contradict other studies showing that spring is often characterized by the release of soil inorganic N (Bardgett *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2006), or by the absence of seasonal cycles in N contents (Bardgett *et al.*, 2007; Werdin-Pfisterer *et al.*, 2009). Our results support the hypotheses that inorganic or organic N released by microbial biomass was, either, immediately re-immobilized by microbial communities, as consistent with a microbial turnover greater than the mineralization rate (Brooks *et al.*, 1996; Fisk *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2004); or that the different N forms (dissolved inorganic nitrogen, DIN and dissolved organic nitrogen DON) released could have been taken up by plants (Fig. 5), denitrified or leached during snowmelt (Schmidt *et al.*, 2007). The evidence for this is two-fold. Firstly, we only recovered 60 to 78 % of the total ¹⁵N one week after the labelling. A substantial loss of

inorganic N by leaching could reduce the DIN pool at the end of snowmelt compared to peak biomass, or N could be incorporated into soil organic matter *via* abiotic processes involving the fixation of NH_4^+ (Johnson *et al.*, 2000). Secondly, the high N-NO_3^- consumption rate in all grasslands, and of N-NH_4^+ in the terraces, confirmed that DIN had been taken up. Because gross microbial N uptake was more limited at the end of snowmelt than at peak biomass, absorption and retention by plant communities of the DIN released by microbial communities is a more likely explanation (Brooks *et al.*, 1998; Jaeger *et al.*, 1999; Bilbrough *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2009).

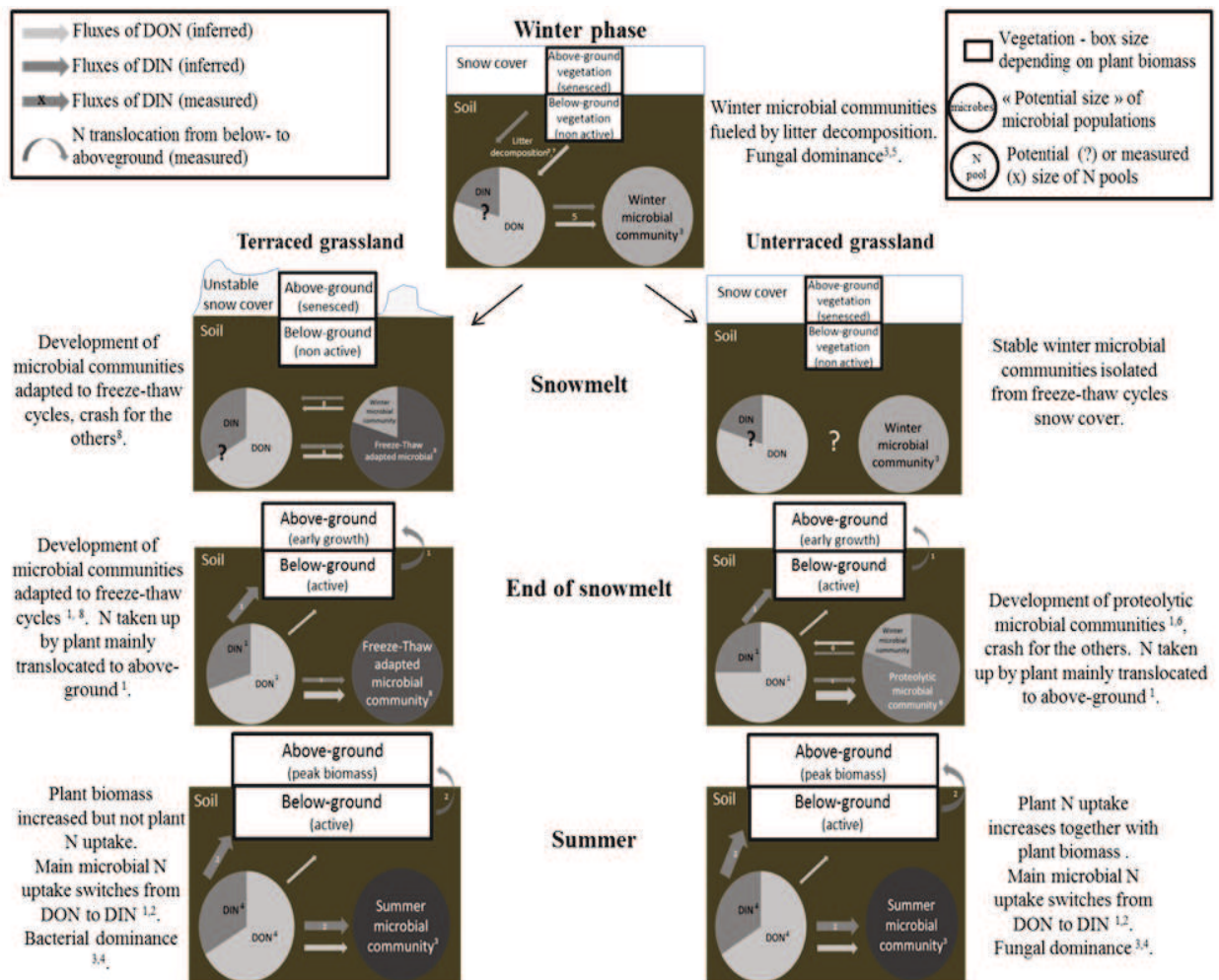


Figure 5. Schematic diagram showing trends in nitrogen (N) pool and flux sizes in the two grasslands, terraced and untterraced, for the different phases of the growing season. The vegetation box size is proportional plant biomass and arrow size is proportional to the N fluxes inferred or measured. Legend: DIN: Dissolved Inorganic Nitrogen; DON: Dissolved Organic Nitrogen. Data sources: 1: this paper; 2: Robson *et al.* 2010; 3: Bardgett *et al.* 2005; 4: Grigulis *et al.* 2013; 5: Schmidt & Lipson 2004; 6: Lipson *et al.* 1999; 7: Saccone *et al.* 2013; 8: Lipson & Monson 1998.

4.2 Variations in plant N uptake between snowmelt and peak biomass

In all grasslands, above-ground N concentrations did not vary between snowmelt and peak biomass but root N concentrations were higher at the end of snowmelt than at peak biomass (Jaeger & Manson, 1992; Bardgett *et al.*, 2002). This suggests that greater root N concentrations in May 2010 may be related either to stored N allowing initial growth and re-allocation to shoots, or to N taken up by roots becoming active before snowmelt (Henry & Jefferies, 2002; Miller *et al.*, 2009). This latter possibility was consistent with our results showing high N uptake by roots followed by fast and active N translocation towards the aboveground parts at the onset of growth after snowmelt. In fact, we observed active total (root + shoot) inorganic N acquisition by plant communities in all grasslands at the end of snowmelt. Even if root N uptake was weaker than at peak biomass, shoot N translocation was at least double that of summer. In other words, after snowmelt, roots were taking up inorganic ^{15}N , but it did not accumulate in the root system as it was immediately transported into the aerial parts of the plants (Fig. 5). These trends for subalpine grasslands are consistent with numerous studies in other cold ecosystems (Jaeger *et al.*, 1999, Bilbrough *et al.*, 2000; Bardgett *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2009). Plant N uptake was also impacted by past land use (terraced vs. unterraced), since plant communities did not benefit in the same way from inorganic N available in the different grasslands. Plant communities on terraced grasslands took up more DIN at the end of snowmelt than at peak biomass, whereas plant communities in unterraced grasslands maintained similar or slightly higher DIN uptake rates at peak biomass. We hypothesize that these differences were linked to differences in RGR between contrasted plant communities present in terraced and unterraced grasslands, since specific plant N uptake (per g biomass) in May 2010 increased when RGR increased. These results suggest that the increase in DIN uptake at the beginning of the season could allow plant species to ensure biomass production even within a short growing season. As such, the results contrast with other studies of alpine or arctic meadows which report that N taken up during spring was not translocated to shoots, but remained in the roots (Edwards & Jefferies, 2010; Jaeger & Monson, 1992). Another explanation could be linked to the ability of species to express different uptake patterns depending on N forms availability (Stahl *et al.*, 2011; Grassein *et al. submitted.*). This is illustrated by soil N-NO_3^- decreasing more strongly in unterraced than in terraced grasslands, and modifying the proportion of the different DIN forms available in soil by an increase of soil $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_3^-$ ratio.

4.3 Microbial N uptake during the growing season

The higher N uptake rates by overall (shoot + root) plant communities contrasted with microbial communities. In fact, we report a lower gross microbial N uptake rate in all grasslands at the end of the snowmelt in comparison to that at peak biomass. Yet, MBN remained similar in terraced grasslands for both sampling dates while, conversely, in unterraced grasslands MBN was smaller at peak biomass than at snowmelt. A similar contrast was evident for the microbial C/N ratio which was greater at peak biomass than at snowmelt only in unterraced fields.

Such an absence of changes across seasons in microbial N pools in terraced grasslands, concurs with one study in a mountain grassland (Bardgett *et al.*, 2007), but contrasts with several other studies in cold ecosystems which described a decrease in microbial N contents and a release of available N at the end of snowmelt, reflecting a microbial crash in response to repeated freeze-thaw cycles (Brooks *et al.*, 1998; Jaeger *et al.*, 1999; Lipson *et al.*, 1999; Bardgett *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2006). This lack of seasonal variability could suggest that these microbial communities are adapted and resistant to freeze-thaw events (Lipson & Monson, 1998), which would limit the microbial crash to a microbial quiescence (Schimel *et al.*, 2007). Consequently, a steady state level of N in microbial biomass could result from N immobilization during winter or, alternatively, an immediate re-immobilization of released N could occur if microbial turnover was greater than the mineralization rate (Fisk *et al.*, 1998). These hypotheses would explain the consistent MBN between snowmelt and peak biomass in spite of a lower gross microbial uptake of ^{15}N tracer in our study. Conversely, to our knowledge, this is the first report of an increase in the microbial N pool at the end of snowmelt, as we observed in unterraced grasslands. These differences between the two sampling dates suggest a change in microbial communities, a hypothesis supported by the coupling of an increasing MBN with a decrease of microbial C:N ratio at the end of the snowmelt. A possible explanation for this is the development of microbial communities with proteolytic abilities allowing them to grow on protein released after the winter microbial community crash (Lipson *et al.*, 1999). These proteolytic communities are characterized by a low C:N ratio and fueled by proteins, which may explain the weak inorganic N microbial uptake at the end of snowmelt in unterraced grasslands (Fig. 5). The differences in soil pH among land uses also support this suggestion since, in contrast to terraces, unterraced

grasslands had an acidic soil, which has been shown to stimulate extracellular protease activity (Henry & Jefferies, 2002).

The consistent level or the increase of MBN in terraced and unterraced grasslands respectively, coupled with the fact that microbial communities were less able to take up inorganic N at the end of snowmelt than at peak biomass, suggested that another N source was available for soil microorganisms. We hypothesize that microbes mainly incorporated DON coming from the turn-over of winter microbial communities not adapted to freeze-thaw cycles (Bardgett *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2007). This occurred at the end of the snowmelt in unterraced grasslands where low DIN pools associated with reduced rates of gross microbial inorganic N uptake could not explain the increase of MBN and concomitant decrease of microbial C:N ratio. Consequently, in unterraced grasslands, DON could represent the main N source for plants and microbes (Harrison *et al.*, 2007), and explain the reduced N-NH_4^+ concentrations and consumption rates at the end of snowmelt. A decrease of net N mineralization rates in unterraced grasslands has already been related to a decline in ammonification rates due to low soil temperatures (Robson *et al.*, 2007), confirming that N-NH_4^+ production can be limited at this time of the year.

Our results highlighted large differences on inorganic N dynamics at two critical times of the growing season. Smaller DIN pools were measured after snowmelt compared to peak biomass, and these were explained by differing plant and microbial N dynamics. In all grasslands, there was a large decrease in microbial DIN uptake at the end of snowmelt, whereas, in the same time, plant communities were assimilating more DIN. This N uptake dynamics was the opposite of that observed at peak biomass by Robson *et al.* (2010). In addition to this N partitioning on these two contrasted sampling dates, the responses of the plant and microbial communities, differed greatly according to the past land use at the site. While no seasonal variations in MBN were observed on terraces, a large increase occurred in unterraced grasslands and was accompanied by a decrease in the microbial C:N ratio. Based on these results, we suggest that proteolytic microbial communities developed in unterraced grasslands where they could assimilate DON from the crash of winter microbial communities rather than inorganic N (Lipson *et al.*, 1999). Benefiting from changes in microbial DIN uptake, plant communities on terraced grasslands maximized their growing capacities as they were able to efficiently assimilate DIN released by the turn-over of winter microbial

communities. On the other hand, in untterraced grasslands, plant communities showed weaker specific N uptake capacities even though they maintained slow and steady growth rates to reach a larger peak biomass. Thus, in the absence of any large sinks for inorganic N in microbial communities at the end of snow melt as during winter, plant communities are therefore likely to represent a large sink for inorganic N at the beginning of the growing season in subalpine grasslands. Further investigations on microbial community composition and their N uptake dynamics through phospholipid fatty acid analysis and isotopic labeling of organic nitrogen, respectively, are required to better understand the decrease in microbial DIN uptake. These additional experiments would test our hypothesis that changes in the soil microbial community structure of these subalpine grasslands occur in the response to land use and seasonal changes.

Acknowledgements

This study was conducted as part of ERA-Net BiodivERsA project VITAL, ANR-08-BDVA-008. The Lautaret site is part of the long term research site Zone Atelier Alpes, a member of the ILTER-Europe and LTSER networks. We acknowledge the Joseph Fourier Alpine research station (CNRS UMS 3370) for infrastructure support, and Hanna Secher-Frommell for help with field and lab measurements at Lautaret.

References

- Baptist, F., Zinger, L., Clement, J.C., Gallet, C., Guillemin, R., Martins, J.M.F., Sage, L., Shahnava, B., Choler, P. & Geremia, R. Tannin impacts on microbial diversity and the functioning of alpine soils: a multidisciplinary approach. *Environmental Microbiology*, **10**, 799-809, 2008.
- Baptist, F., H. Secher-Fromell, F. Viard-Cretat, I. Aranjuelo, J. C. Clement, A. Creme, M. Desclos, P. Laine, S. Nogues, and S. Lavorel. Carbohydrate and nitrogen stores in *Festuca paniculata* under mowing explain dominance in subalpine grasslands. *Plant Biology* 15:395-404, 2013.
- Bardgett, R.D., Streeter, T.C., Cole, L. & Hartley, I.R. Linkages between soil biota, nitrogen availability, and plant nitrogen uptake in a mountain ecosystem in the Scottish Highlands. *Applied Soil Ecology*, **19**, 121-134, 2002.
- Bardgett, R. D., W. D. Bowman, R. Kaufmann, and S. K. Schmidt. A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 634-641, 2005.
- Bardgett, R. D., R. van der Wal, I. S. Jonsdottir, H. Quirk, and S. Dutton. Temporal variability in plant and soil nitrogen pools in a high-Arctic ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**, 2129-2137, 2007.
- Bilbrough, C.J., Welker, J.M. & Bowman, W.D. Early spring nitrogen uptake by snow-covered plants: A comparison of arctic and alpine plant function under the snowpack. *Arctic Antarctic and Alpine Research*, **32**, 404-411, 2000.
- Bowman, W.D., Bahnj, L. & Damm, M. Alpine landscape variation in foliar nitrogen and phosphorus concentrations and the relation to soil nitrogen and phosphorus availability. *Arctic Antarctic and Alpine Research*, **35**, 144-149, 2003.
- Brookes, P.C., Kragt, J.F., Powlson, D.S. & Jenkinson, D.S. Chloroform Fumigation And The Release Of Soil-Nitrogen - The Effects Of Fumigation Time And Temperature. *Soil Biology & Biochemistry*, **17**, 831-835, 1985.
- Brooks, P.D., Williams, M.W. & Schmidt, S.K. Microbial activity under alpine snowpacks, Niwot Ridge, Colorado. *Biogeochemistry*, **32**, 93-113, 1996.
- Brooks, P.D., Williams, M.W. & Schmidt, S.K. Inorganic nitrogen and microbial biomass dynamics before and during spring snowmelt. *Biogeochemistry*, **43**, 1-15, 1998.

- Clement, J.C., Robson, T.M., Guillemain, R., Saccone, P., Lochet, J., Aubert, S. & Lavorel, S. The effects of snow-N deposition and snowmelt dynamics on soil-N cycling in marginal terraced grasslands in the French Alps. *Biogeochemistry*, **108**, 297-315, 2012.
- Edwards, K.A., McCulloch, J., Kershaw, G.P. & Jefferies, R.L. Soil microbial and nutrient dynamics in a wet Arctic sedge meadow in late winter and early spring. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**, 2843-2851, 2006.
- Edwards, K. A. and R. L. Jefferies. Nitrogen uptake by *Carex aquatilis* during the winter-spring transition in a low Arctic wet meadow. *Journal of Ecology*, **98**, 737-744, 2010.
- Finzi, A.C., Austin, A.T., Cleland, E.E., Frey, S.D., Houlton, B.Z. & Wallenstein, M.D. Responses and feedbacks of coupled biogeochemical cycles to climate change: examples from terrestrial ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **9**, 61-67, 2011.
- Fisk, M.C., Schmidt, S.K. & Seastedt, T.R. Topographic patterns of above- and belowground production and nitrogen cycling in Alpine tundra. *Ecology*, **79**, 2253-2266, 1998.
- Girel, J., Quetier, F., Bignon, A. & Aubert, S. Histoire de l'Agriculture en Oisans. Station Alpine Joseph Fourier, Grenoble, France, 2010.
- Grigulis, K., Lavorel S., Krainer U., Legay N., Baxendale C., Dumont M., Kastl E., Arnoldi C., Bardgett R. D., Poly F., Pommier T., Schlöter M., Tappeiner U., Bahn M., and Clément J.-C.. Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services. *Journal of Ecology*, **101**, 47-57, 2013.
- Grassein F., Legay N., Arnoldi C., Segura. R., Laine P., Lavorel S., Clément J.C. Different plants strategies in N uptake are associated with above-ground and below-ground functional syndromes for plant traits. *Journal of Ecology*, submitted.
- Harrison, K.A., Bol, R. & Bardgett, R.D. Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. *Ecology*, **88**, 989-999, 2007.
- Harrison, K.A., Bol, R. & Bardgett, R.D. Do plant species with different growth strategies vary in their ability to compete with soil microbes for chemical forms of nitrogen? *Soil Biology & Biochemistry*, **40**, 228-237, 2008.
- Henry, H.A.L. & Jefferies, R.L. Free amino acid, ammonium and nitrate concentrations in soil solutions of a grazed coastal marsh in relation to plant growth. *Plant Cell and Environment*, **25**, 665-675, 2002.

- Jaeger, C. H. and R. K. Monson. Adaptive significance of nitrogen storage in *Bistorta-Bistortoides*, an alpine herb. *Oecologia*, **92**, 578-585, 1992.
- Jaeger, C.H., Monson, R.K., Fisk, M.C. & Schmidt, S.K. Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. *Ecology*, **80**, 1883-1891, 1999.
- Johnson, D.W., Cheng, W. & Burke, I.C. Biotic and abiotic nitrogen retention in a variety of forest soils. *Soil Science Society of America Journal*, **64**, 1503-1514, 2000.
- Jones, D.L. & Willett, V.B. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**, 991-999, 2006.
- Kaye, J.P. & Hart, S.C. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, **12**, 139-143, 1997.
- Lipson, D. & Nasholm, T. The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia*, **128**, 305-316, 2001.
- Lipson, D.A. & Monson, R.K. Plant-microbe competition for soil amino acids in the alpine tundra: effects of freeze-thaw and dry-rewet events. *Oecologia*, **113**, 406-414, 1998.
- Lipson, D.A., Schmidt, S.K. & Monson, R.K. Links between microbial population dynamics and nitrogen availability in an alpine ecosystem. *Ecology*, **80**, 1623-1631, 1999.
- Malik, T. and H. Smith. A resource-based model of microbial quiescence. *Journal of Mathematical Biology*, **53**, 231-252, 2006.
- Mancinelli, R.L. Population-Dynamics Of Alpine Tundra Soil Bacteria, Niwot Ridge, Colorado Front Range, Usa. *Arctic and Alpine Research*, **16**, 185-192, 1984.
- Miller, A.E., Schimel, J.P., Sickman, J.O., Skeen, K., Meixner, T. & Melack, J.M. Seasonal variation in nitrogen uptake and turnover in two high-elevation soils: mineralization responses are site-dependent. *Biogeochemistry*, **93**, 253-270, 2009.
- Mullen, R.B., Schmidt, S.K. & Jaeger, C.H. Nitrogen uptake during snowmelt by the snow buttercup, *Ranunculus adoneus*. *Arctic and Alpine Research*, **30**, 121-125, 1998.
- Quetier, F., Lavorel, S., Thuiller, W. & Davies, I. Plant-trait-based modeling assessment of ecosystem-service sensitivity to land-use change. *Ecological Applications*, **17**, 2377-2386, 2007.
- Quetier, F., Thebault, A. & Lavorel, S. Plant traits in a state and transition framework as markers of ecosystem response to land-use change. *Ecological Monographs*, **77**, 33-52, 2007.

- Robson, T.M., Baptist, F., Clement, J.C. & Lavorel, S. Land use in subalpine grasslands affects nitrogen cycling via changes in plant community and soil microbial uptake dynamics. *Journal of Ecology*, **98**, 62-73, 2010.
- Robson, T.M., Lavorel, S., Clement, J.C. & Le Roux, X. Neglect of mowing and manuring leads to slower nitrogen cycling in subalpine grasslands. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**, 930-941, 2007.
- Saccone, P., S. Morin, F. Baptist, J.-M. Bonneville, M.-P. Colace, F. Domine, M. Faure, R. Geremia, J. Locht, F. Poly, S. Lavorel, and J.-C. Clément. The effects of snowpack properties and plant strategies on litter decomposition during winter in subalpine meadows. *Plant and Soil*, **363**, 215-229, 2013.
- Schimel, J.P. & Chapin, F.S. Tundra plant uptake of amino acid and NH_4^+ nitrogen in situ: Plants compete well for amino acid N. *Ecology*, **77**, 2142-2147, 1996.
- Schimel, J.P. & Clein, J.S. Microbial response to freeze-thaw cycles in tundra and taiga soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **28**, 1061-1066, 1996.
- Schimel, J., T. C. Balser, and M. Wallenstein. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, **88**, 1386-1394, 2007.
- Schirpke, U., G. Leitinger, E. Tasser, M. Schermer, M. Steinbacher, and U. Tappeiner. Multiple ecosystem services of a changing Alpine landscape: past, present and future. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management*, 11-13, 2012.
- Schmidt, S. K. and D. A. Lipson. Microbial growth under the snow: Implications for nutrient and allelochemical availability in temperate soils. *Plant and Soil*, **259**, 1-7, 2004.
- Schmidt, S.K., Costello, E.K., Nemergut, D.R., Cleveland, C.C., Reed, S.C., Weintraub, M.N., Meyer, A.F. & Martin, A.M. Biogeochemical consequences of rapid microbial turnover and seasonal succession in soil. *Ecology*, **88**, 1379-1385, 2007.
- Stahl, V. M., W. Beyschlag, and C. Werner. Dynamic niche sharing in dry acidic grasslands - a N-15 -labeling experiment. *Plant And Soil*, **344**, 389-400, 2011.
- Stark, J.M.. Nutrient Transformations . Pages 215-234 in O.E. Sala, R.B. Jackson, H.A. Mooney, and R. Howarth (eds.), *Methods in Ecosystem Science*. Springer-Verlag New York, 2000.

- Stark, J.M. & Hart, S.C. Diffusion technique for preparing salt solutions, Kjeldahl digests, and persulfate digests for nitrogen-15 analysis. *Soil Science Society of America Journal*, **60**, 1846-1855, 1996.
- Steenwerth, K. L., L. E. Jackson, F. J. Calderon, M. R. Stromberg, and K. M. Scow. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**, 1599-1611, 2002.
- Strickland, M. S., M. A. Callahan, C. A. Davies, C. L. Lauber, K. Ramirez, D. D. Richter, N. Fierer, and M. A. Bradford. Rates of in situ carbon mineralization in relation to land-use, microbial community and edaphic characteristics. *Soil Biology & Biochemistry*, **4**, 260-269, 2010.
- Van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. & van Straalen, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, **11**, 296-310, 2008.
- Viard-Cretat, F., C. Gallet, M. Lefebvre, and S. Lavorel. A leachate a day keeps the seedlings away: mowing and the inhibitory effects of *Festuca paniculata* in subalpine grasslands. *Annals of Botany*, **103**, 1271-1278, 2009.
- Weigelt, A., Bol, R. & Bardgett, R.D. Preferential uptake of soil nitrogen forms by grassland plant species. *Oecologia*, **142**, 627-635, 2005.
- Werdin-Pfisterer, N.R., Kielland, K. & Boone, R.D. Soil amino acid composition across a boreal forest successional sequence. *Soil Biology & Biochemistry*, **41**, 1210-1220, 2009.
- Zeller, V., Bahn, M., Aichner, M. & Tappeiner, U. Impact of land-use change on nitrogen mineralization in subalpine grasslands in the Southern Alps. *Biology and Fertility of Soils*, **31**, 441-448, 2000.

Supporting Information legends

Appendix C1. (a) The soil pools of nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+) and (b) microbial biomass N in the upper 10 cm of each land use type prior to inoculation. (c) Plant nitrogen (N) and (d) plant biomass.

Appendix C2. (a) Soil nitrogen (N) flux per day. (b) Microbial N uptake, and (c, d) plant N uptake per day.

Table 2. Effect of sampling date, “time” (end of snowmelt vs. peak biomass), and interaction with past (terraced vs. unterraced) and current (mown vs. unmown) land uses on N pools and fluxes of soil, plant and microbial communities. Values are results of ANOVAs (F) and significance (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: not significant).

	Past		Current		Past x Current		Time		Past x Time		Current x Time		Past x Current x Time	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
a) Soil N pools														
N-NO ₃ ⁻ (ug N.g ⁻¹ soil)	128.39	***	2.90	ns	0.33	ns	157.6	***	0.12	ns	8.27	*	0.77	ns
N-NH ₄ ⁺ (ug N.g ⁻¹ soil)	10.95	**	0.52	ns	7.48	*	62.2	***	21.57	***	0.16	ns	5.1	*
Microbial biomass N (g N.m ⁻² area)	16.08	**	0.61	ns	0.52	ns	5.85	*	17.29	***	0.09	ns	3.64	ns
Microbial C/N	0.64	ns	0.83	ns	1.4	ns	61.15	***	17.51	***	0.15	ns	0.01	ns
Above-ground plant (mg N.g ⁻¹ biomass)	1.67	ns	2.75	ns	0.59	ns	0.01	ns	1.35	ns	0.01	ns	0.01	ns
Above-ground plant (g N.m ⁻² area)	34.82	ns	1.42	ns	1.72	ns	24.87	***	0.03	ns	3.21	ns	0.01	ns
Root (mg N.g ⁻¹ biomass)	35.08	***	0.19	ns	1.26	ns	5.05	*	5.86	*	0.21	ns	1.77	ns
Root (g N.m ⁻² area)	4.83	*	4.75	*	2.14	ns	14.18	**	0.19	ns	1.66	ns	0.05	ns
b) Soil inorganic N fluxes														
Gross N-NO ₃ ⁻ consumption rate (ug N.g ⁻¹ soil.day ⁻¹)	10.74	**	3.67	ns	1.31	ns	72.15	***	6.39	*	0.05	ns	1.31	ns
Gross N-NH ₄ ⁺ consumption rate (ug N.g ⁻¹ soil.day ⁻¹)	18.93	***	5.77	*	0.08	ns	0.38	ns	12.69	**	2.1	ns	3.32	ns
Microbial specific N uptake rate per (ug N.g ⁻¹ biomass.day ⁻¹)	28.01	***	0.01	ns	0.32	ns	0.7	ns	10.85	**	0.02	ns	0.77	ns
Microbial N uptake rate per field area (mg N.m ⁻² area)	34.51	***	0.91	ns	1.29	ns	120.62	***	17.96	***	1.03	ns	1.08	ns
Above-ground specific N uptake rate (mg N.g ⁻¹ biomass. day ⁻¹)	0.27	ns	4.02	ns	7.86	*	106.58	***	6.01	*	1.16	ns	5.84	*
Above-ground uptake rate per field area (mg N.m ⁻² . day ⁻¹)	3.05	ns	0.5	ns	1.18	ns	0.64	ns	4.5	ns	1.03	ns	1.54	ns
Root specific N uptake rate (mg N.g ⁻¹ biomass. day ⁻¹)	0.05	ns	3.03	ns	3.31	ns	51.74	***	10.16	**	6.61	*	12.72	**
Root N uptake rate per field area (g N.m ⁻² . day ⁻¹)	1.48	ns	2.84	ns	0.91	ns	39.46	***	17.65	***	2.29	ns	7.71	*
Total plant specific N uptake rate (mg N.g ⁻¹ biomass. day ⁻¹)	0.19	ns	5.78	*	8.61	**	46.68	***	9.33	**	2.23	ns	12.5	**
Total plant N uptake rate per field area (g N.m ⁻² . day ⁻¹)	0.26	ns	0.57	ns	4.55	*	3.64	ns	20.16	***	9.12	**	5.45	*

Supporting information

Appendix C1: (a) The soil pools of nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+) and (b) microbial biomass N in the upper 10 cm of each land use type prior to inoculation. (c) Plant nitrogen (N) and (d) plant biomass. Data from four 200-cm² areas per fields were amalgamated to give mean values of three fields per land use \pm 1SE. Different letters within groups represent $p < 0.05$.

	Terraced		Unterraced	
	Mown	Unmown	Mown	Unmown
a) Soil N pools				
N- NO_3^- ($\mu\text{g N.g}^{-1}$ soil)	3.7 ± 1.3^B	8.3 ± 0.9^A	0.2 ± 0.01^C	1.1 ± 0.3^{BC}
N- NO_3^- (mg N.m^{-2} area)	458.1 ± 161.3^B	1073.8 ± 125.8^A	24.1 ± 5.9^C	121.8 ± 33.8^{BC}
N- NH_4^+ ($\mu\text{g N.g}^{-1}$ soil)	21.7 ± 2.1^A	15.7 ± 1.7^A	12.9 ± 2.1^A	22.1 ± 4.8^A
N- NH_4^+ (mg N.m^{-2} area)	2646.3 ± 261.6^A	2595.1 ± 227.3^{AB}	1382.1 ± 214.8^B	2595.1 ± 563.7^A
N- NH_4^+ / N- NO_3^- ratio	8.5 ± 3.9^B	1.9 ± 0.3^C	59.3 ± 2.3^A	25.4 ± 7.8^A
b) Microbial N pools				
Microbial biomass N ($\mu\text{g N.g}^{-1}$ soil)	150.4 ± 16.9^A	117.7 ± 29.8^A	137.5 ± 27.7^A	164.1 ± 17.1^A
Microbial biomass N (g N.m^{-2} area)	18.3 ± 2.1^A	15.1 ± 3.8^A	14.6 ± 2.9^A	19.2 ± 2.0^A
Microbial C : N ratio	6.4 ± 0.2^A	7.2 ± 0.2^A	5.1 ± 0.1^B	4.8 ± 0.2^B
c) Plant N pools				
Above-ground plant (mg N.g^{-1} biomass)	20.1 ± 1.8^A	20.8 ± 2.5^A	21.6 ± 1.5^A	24.2 ± 1.2^A
Above-ground plant (g N.m^{-2} area)	3.9 ± 0.8^C	4.5 ± 0.8^{BC}	7.2 ± 0.6^{AB}	10.0 ± 1.3^A
Root (mg N.g^{-1} biomass)	11.9 ± 1.1^{AB}	12.8 ± 0.8^A	8.4 ± 1.0^{BC}	6.3 ± 1.2^C
Root (g N.m^{-2} area)	9.3 ± 1.1^A	5.6 ± 0.2^A	9.4 ± 1.9^A	8.1 ± 1.1^A
d) Plant Biomass				
Above-ground plant biomass (g.m^{-2} area)	193.9 ± 32.7^B	230.4 ± 67.6^B	338.9 ± 28.5^{AB}	413.2 ± 54.4^A
Relative growth rate ($\text{mg.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	82.5 ± 18.7^A	94.5 ± 29.6^A	36.5 ± 7.0^B	24.5 ± 3.3^B
Root biomass (g.m^{-2} area)	784.7 ± 47.7^B	446.5 ± 46.2^C	1102.6 ± 91.0^A	1311.0 ± 115.5^A

Appendix C2: (a) Soil nitrogen (N) flux per day, calculated using the ^{15}N pool dilutions for 48 h after inoculation from the isotope dilution equations of Kirkham & Bartholomew. (b) Microbial N uptake, and (c, d) plant N uptake per day, calculated for the same period using the ^{15}N pool dilution equations of described in Stark (2010). Data from four 200-cm² areas per fields were amalgamated to give mean values of three fields per land use \pm 1SE. Different letters within groups represent $p < 0.05$.

	Terraced		Unterraced	
	Mown	Unmown	Mown	Unmown
a) Soil N flux				
Gross N-NO ₃ ⁻ consumption rate ($\mu\text{g N.g}^{-1} \text{ soil.day}^{-1}$)	28.3 \pm 6.7 ^A	16.8 \pm 6.3 ^A	17.25 \pm 4.5 ^A	19.0 \pm 4.9 ^A
Gross N-NO ₃ ⁻ consumption rate ($\text{mg N.m}^{-2} \text{ .day}^{-1}$)	3448 \pm 818 ^A	2162 \pm 816 ^A	1835 \pm 480 ^A	2232 \pm 586 ^A
Gross N-NH ₄ ⁺ consumption rate ($\mu\text{g N.g}^{-1} \text{ soil.day}^{-1}$)	22.3 \pm 4.2 ^A	16.7 \pm 3.1 ^{AB}	8.6 \pm 1.1 ^B	9.9 \pm 2.1 ^B
Gross N-NH ₄ ⁺ consumption rate ($\text{mg N.m}^{-2} \text{ .day}^{-1}$)	2719 \pm 519 ^A	2158 \pm 405 ^{AB}	917 \pm 116 ^B	1165 \pm 242 ^B
b) Microbial N uptake				
Specific N uptake rate per g soil ($\mu\text{g N.g}^{-1} \text{ biomass.day}^{-1}$)	66.7 \pm 6.9 ^A	58.7 \pm 4.9 ^A	48.76 \pm 13.1 ^A	55.8 \pm 8.1 ^A
Gross N uptake rate per field area ($\text{mg N.m}^{-2} \text{ area}$)	2144.5 \pm 624.9 ^A	956.5 \pm 153.9 ^A	1109.5 \pm 198.1 ^A	1202.6 \pm 372.5 ^A
c) Plant N translocation to above-ground biomass				
Specific N uptake rate ($\text{mg N.g}^{-1} \text{ biomass. day}^{-1}$)	19.2 \pm 0.9 ^{AB}	28.7 \pm 3.6 ^A	26.5 \pm 13.4 ^A	14.9 \pm 1.5 ^B
N uptake rate per field area ($\text{mg N.m}^{-2} \text{ .day}^{-1}$)	2401.7 \pm 1103.7 ^{AB}	3812.2 \pm 438.3 ^A	1545.3 \pm 87.5 ^B	1550.5 \pm 437.9 ^B
d) Plant root N uptake				
Specific N uptake rate ($\text{mg N.g}^{-1} \text{ biomass. day}^{-1}$)	1.8 \pm 0.5 ^{BC}	4.3 \pm 0.3 ^A	2.8 \pm 0.5 ^B	1.0 \pm 0.3 ^C
N uptake rate per field area ($\text{g N.m}^{-2} \text{ .day}^{-1}$)	456.3 \pm 183.3 ^{AB}	718.2 \pm 115.2 ^A	443.8 \pm 27.2 ^{AB}	240.8 \pm 43.2 ^B

Article 6

Different plants strategies in N uptake are associated with above-ground and below-ground functional syndromes for plant traits

Grassein F., Legay N., Arnoldi C., Segura. R., Laîné P., Lavorel S., Clément J.C.

Submitted to Journal of Ecology

Abstract

1- Relationships between plant functional strategies (conservative versus exploitative strategies) and leaf functional traits have been widely documented and support a generic leaf economics spectrum, but knowledge about a similar link with root traits remains comparatively scarce. To generalize the leaf economics spectrum to the whole plant, relationships between leaf and root traits, but also between these functional traits and root nitrogen uptake are an important gap to fill.

2- We measured functional traits of leaves and roots, and estimated root N uptake using ^{15}N Nitrogen (N) labelling of excised roots in standardized conditions. We focused on three grass species from subalpine grasslands with contrasted functional strategies. Leaf and root traits of species as proxies for their root N uptake ability were tested in different environmental conditions by sampling grasslands with distinct management and throughout the growing season.

3- Although we did not detect strong correlations between analogous traits (e.g. N content) at the root and leaf levels, we observed similar trade-offs within both compartments (e.g. between dry matter content and N content), supporting the generalization of the economics spectrum to the whole plant. This spectrum of traits, and especially root traits, was related with N uptake with higher N uptake for species with an exploitative syndrome.

4- Despite contrasted strategies, grass species took up mainly ammonium rather than nitrate including the more conservative *Festuca paniculata* which had higher relative preference for ammonium than the two other species. Moreover, N uptake varied during the growing season as well as in response to soil properties under different managements.

6- Synthesis: Similar trade-offs between functional traits were observed for leaves and roots supporting the applicability of the economics spectrum at the whole plant level. Our results also demonstrated that increasing N uptake with more exploitative root and leaf traits. Nitrogen uptake was also influenced by environmental conditions such as management or time during the growing season, and could modulate the trait-driven N uptake ability, highlighting the importance to take into account below-ground characteristics (roots and soil) in plant ecology.

Keywords: Ecophysiology, Leaf and root functional traits, Nitrate and ammonium uptake, Resource use strategy

INTRODUCTION

Functional traits have been widely used to describe different plant strategies (Lavorel *et al.* 1997, Westoby *et al.* 2002). One major axis of specialisation involves a trade-off between conservation of resources in well protected and long lived tissues, and acquisition of resources by tissue with high use-efficiency and turn-over (Wright *et al.* 2004). This continuum, known as leaf economic spectrum (LES), has been widely studied and validated in a large range of ecosystems (Diaz *et al.* 2004, Baltzer *et al.* 2010). It has also been applied to relate leaf functional traits to processes such as photosynthesis or litter decomposability (Reich *et al.* 1997, Cornwell *et al.* 2008). Granted that similar trade-offs to those observed for leaf traits also apply to root traits, the LES could be extended to the whole plant (Roumet *et al.* 2006, Freschet *et al.* 2010). However, relationships between below-ground and above-ground traits remain poorly documented. Depending on species and environmental conditions, inconsistent relationships have been reported between analogous root and shoot traits, e.g. N concentration or dry matter content (Craine & Lee 2003, Craine *et al.* 2005, Tjoelker *et al.* 2005). The lack of consistent relationships between roots and leaves could be critical to relate leaf traits and N root uptake. Despite positive relationships between the LES and leaf N concentration (Wright *et al.* 2004) which would suggest positive associations between exploitative strategy and N uptake, evidence for direct relationships between the LES and N uptake by roots remains scarce (Osone & Tateno 2005, Maire *et al.* 2009).

Differences between species in their resource uptake are common, and niche partitioning for N has been proposed as a way to promote species coexistence (Tilman 1994, Bardgett *et al.* 2002, MacKane *et al.* 2002). This could involve a partitioning in time (Jaeger *et al.* 1999, Stahl *et al.* 2011) or for different chemical forms (Miller & Bowman 2002, Weigelt *et al.* 2005). Species are also dependent on N availability in soil, in quantity and in quality, while N cycling is influenced by climatic conditions as well as management (Bardgett *et al.* 2005, Robson *et al.* 2010, Clement *et al.* 2012). While there is plentiful evidence for the effects of these drivers on N cycling or plant properties, few studies have focused on the variation of N uptake by plants in response to environmental conditions throughout the growing season, or in response to management (Jaeger *et al.* 1999, Miller *et al.* 2009, Stahl *et al.* 2011, Andersen & Turner 2013). Functional traits have been increasingly used in the study of community assembly mechanisms such as limiting similarity or complementarity (Götzenberger *et al.* 2012), but they have been largely overlooked in N uptake studies in spite of promising links between traits and N uptake on one hand (Maire *et al.* 2009), and abundant evidences for

relationships between traits and ecosystem processes on the other hand (De Bello *et al.* 2010, Lavorel 2013).

Differences between species in their N uptake patterns have been widely observed, albeit rarely combined with functional traits. N uptake is commonly assessed using ^{15}N stable isotope in glasshouse or natural conditions, each method having their respective advantages and drawbacks (Lucash *et al.* 2007). To be representative of species ability to take up nitrogen relative to the field conditions, uptake estimation can be achieved by adding ^{15}N solution directly in the field, giving for example insights in the competitiveness of different species for N pools. Nevertheless, this approach does not allowed estimating properly N uptake for a given species without influence of other parameters and can limit the ability to compare different species due to different conditions during the uptake estimation such as pH or temperature. While some studies have highlighted some reserves about this approach (Bloom & Caldwell 1988, Falkengren-Grerup *et al.* 2000), the estimation of N uptake using excised roots in laboratory for individuals of various speices collected in the field is an interesting way to compare N uptake assuming no variations in other parameters (Leon *et al.* 1995, Louahlia *et al.* 2000). This approach has been shown to provide comparable results to other methods (Kahmen *et al.* 2009) and has already been successfully used to compare N uptake between species with contrasting traits (Maire *et al.* 2009).

We studied the relationships between various plant functional traits measured on roots and leaves to link functional syndromes with the potential N uptake of three grass species, *Bromus erectus*, *Dactylis glomerata* and *Festuca paniculata*, with contrasted resource use strategies (Gross *et al.* 2007, Grassein *et al.* 2010). Our study focused on subalpine grasslands with seasonal climatic variations and various management activities that both strongly affect N cycling and plant communities (Quétier *et al.* 2007, Robson *et al.* 2010). By measuring functional traits of both roots and leaves, we aimed (1) to confirm the validity of the trade-off between conservation and exploitation of resources at the whole plant level, (2) to relate functional traits to *in situ* potential N uptakes assessed by *ex-situ* measurements on excised roots, and (3) to compare patterns of N uptake for different N forms and across the growing season.

MATERIAL AND METHODS

Study site

The site is located in the upper Romanche valley of the central French Alps (45°02' N, 6°20' E, 1650-2000m a.s.l.) between the village of Villar d'Arêne and the Lautaret Pass. The climate is subalpine with a strong continental influence. Winters are cold and snowy, with monthly average minimum temperatures of -15.9°C in February, maximum monthly average temperature of 23.8°C in July, and mean annual precipitation of 956mm (personal communication, sajf.ujf-grenoble.fr). The growing season starts following snow melt in late April to early May and continues until late September or October depending on the date of the first snow autumns.

Four grasslands were chosen for their contrasted past and current management, and were similar to the grasslands studied by Robson *et al.* (2007, 2010): (i) Terraced Mown and Fertilized (TMF), (ii) Terraced Unmown not fertilized but lightly grazed (TU), (iii) Unterraced Mown grasslands (UM) and (iv) Unterraced Unmown but lightly grazed grasslands (UU), representing a gradient of decreasing management intensity. We selected three grass species, *Dactylis glomerata* L., *Bromus erectus* Huds and *Festuca paniculata* Schinz et Tell, that were abundant in at least one of these four grasslands (Quétier *et al.* 2007), and which span a gradient from exploitative to conservative resource use strategies (Gross *et al.* 2007, Grassein *et al.* 2010).

Following field dominance patterns, *D. glomerata* was sampled in TMF, *B. erectus* in TU, *F. paniculata* in UM, and all species were sampled in UU where they coexist, although *F. paniculata* is dominant. Each of three sampling sessions in 2010 involved the excavation of five individuals (genetically distinct individuals at least 2m apart) with their roots and soil. The first sampling corresponded to the beginning of the growing season, 3-4 weeks after snow melt based on plant phenology to adjust for differences across grasslands in elevation and thus with date of snow melt. The second sampling targeted flowering onset (just before anthesis), and the third date corresponded to autumn. For *D. glomerata* in TMF and *B. erectus* in TU, the three sampling dates were mid-May, mid-June, and mid-September. For *F. paniculata* in UM and the three species in UU, the sampling dates were: mid-June, early July, early September. These three dates are called “Spring”, “Summer” and “Autumn” hereafter.

Soil nitrogen pools

At each date and for each grassland, soil nitrogen contents were measured on six soil cores (dimensions 4.5 cm Ø, 15 cm of depth) kept on ice in the field and maintained at 4°C upon return to the laboratory (within 2h). Soils were sieved through a 5.6-mm mesh to remove roots and stones. Two subsamples of 10 g fresh sieved soil were prepared respectively for extraction of mineral N in 0.5M K₂SO₄, and for chloroform fumigation followed by 0.5M K₂SO₄ extraction to yield microbial N. Chloroform fumigation was performed for 7 days (following Brookes *et al.* 1985). Each K₂SO₄ extract was analysed using a colorimetric analyser (FS-IV autoanalyser (OI-Analytical, College Station, TX, USA) (following Bowman *et al.* 2003), to measure soil contents of ammonium (NH₄⁺), nitrate (NO₃⁻) and Total Dissolved Nitrogen (TDN). Soil aliquots were used to determine soil water content (7 days at 70°C) and soil organic matter (550°C during 4 hours). Finally, soil subsamples were air-dried to measure soil pH, or ground to a fine powder for total carbon (C) and N contents using an elemental analyser (FlashEA 1112, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Nitrogen uptake and functional traits

At each of the three dates, five individuals, with roots and soil, were excavated for each field and species and transferred to the laboratory located at the Lautaret Pass (Station Alpine Joseph Fourier) within half an hour. Roots were washed with deionised water, cut to 2-cm length and stored in 1mM CaSO₄ for less than two hours to limit the uptake decline starting around three hours after excision (Louahlia *et al.* 2000). Root samples from each individual were separated into 14 sub-samples of approximately 0.5g fresh mass. Two sub-samples were used to estimate root dry matter content (RDMC), and were further analysed to obtain root-¹⁵N natural abundance. The other sub-samples were incubated for one hour in a buffer solution (pH=5.5) following Leon *et al.* (1995), containing a range of N concentrations (20, 50, 100, 250, 500 and 1000 µM). Six sub-samples were incubated in K¹⁵NO₃ (99% excess) and the other six in (¹⁵NH₄)₂SO₄ (99% excess). Solution volumes and fresh weights were set to avoid N depletion of the solution greater than 10% of the initial concentration (calculated with data from a parallel experiment estimating N uptake of plants grown in optimal conditions). After 1h incubation, roots were washed twice for one minute with a 1mM CaSO₄ at 4°C to stop any metabolic processes. Roots were then dried at 60°C for 72h, ground to a fine powder and analysed by IRMS at the University of Caen (Isoprime GV instruments) to obtain ¹⁵N Atom% and N root concentration (RNC). Specific leaf area (SLA), leaf dry matter

content (LDMC), leaf nitrogen concentration (LNC) and specific root length (SRL, Winrhizo® software) were measured following Cornelissen *et al.* (2003).

Data analysis

Nitrogen Uptake Rate (NUR) was calculated for each concentration and each inorganic N form (NH_4^+ and NO_3^-) using the increase of ^{15}N in the root incubated compared to the non-incubated control, and expressed by unit of time and dry mass ($\text{nmolN.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ of dry roots, see Leon *et al.* 1995). The dependence of NUR to substrate concentration was fitted for each individual and we used Hanes's relations (Michaelis transformation) to estimate the maximum uptake rate (V_{max}) defined as the maximum NUR for NH_4^+ and NO_3^- (Leon *et al.* 1995). We computed the $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ uptake ratio as the ratio between $\text{NH}_4^+ V_{\text{max}}$ and $\text{NO}_3^- V_{\text{max}}$.

Relationships between functional traits of leaves and roots, and uptake ability were investigated using Pearson correlation coefficients. A Principal Component Analysis (PCA) was conducted to explore the relationships between individual plant functional traits (SLA, LDMC, LNC, SRL, RDMC and RNC), and their variability within species. Relationships between functional syndromes (PCA axes) and uptake ability were investigated using linear regression models. A canonical ordination using a Redundancy Analysis (RDA) was performed to explore the relationships between uptake parameters and soil parameters, and also to explore the effects of management and date on soil parameters: soil water content (SWC), soil organic matter (SOM), pH, total dissolved nitrogen (TDN), soil ammonium (NH_4^+) and the soil ratio of ammonium to nitrate ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$).

All statistical analyses were performed using the R software R 2.14.0 (R Foundation for Statistical Computing), and multivariate analyses were performed with the packages Ade4 (PCA) and VEGAN (RDA).

RESULTS

Relationships between functional traits at the leaf and root levels

The PCA primary axis scores for root and leaf functional traits (Fig. 1) differed greatly between species. This axis opposed various dates and sampling sites for *D. glomerata* and *F. paniculata*, while *B. erectus* appeared as intermediate between the two other species. This

axis was mainly related to leaf functional traits (SLA and LNC) as well as to root functional traits (SRL and RDMC). Along the second axis, *B. erectus* was mainly characterised with negative scores associated with high values of LDMC and RNC, while *F. paniculata* was characterised by positive values for these traits.

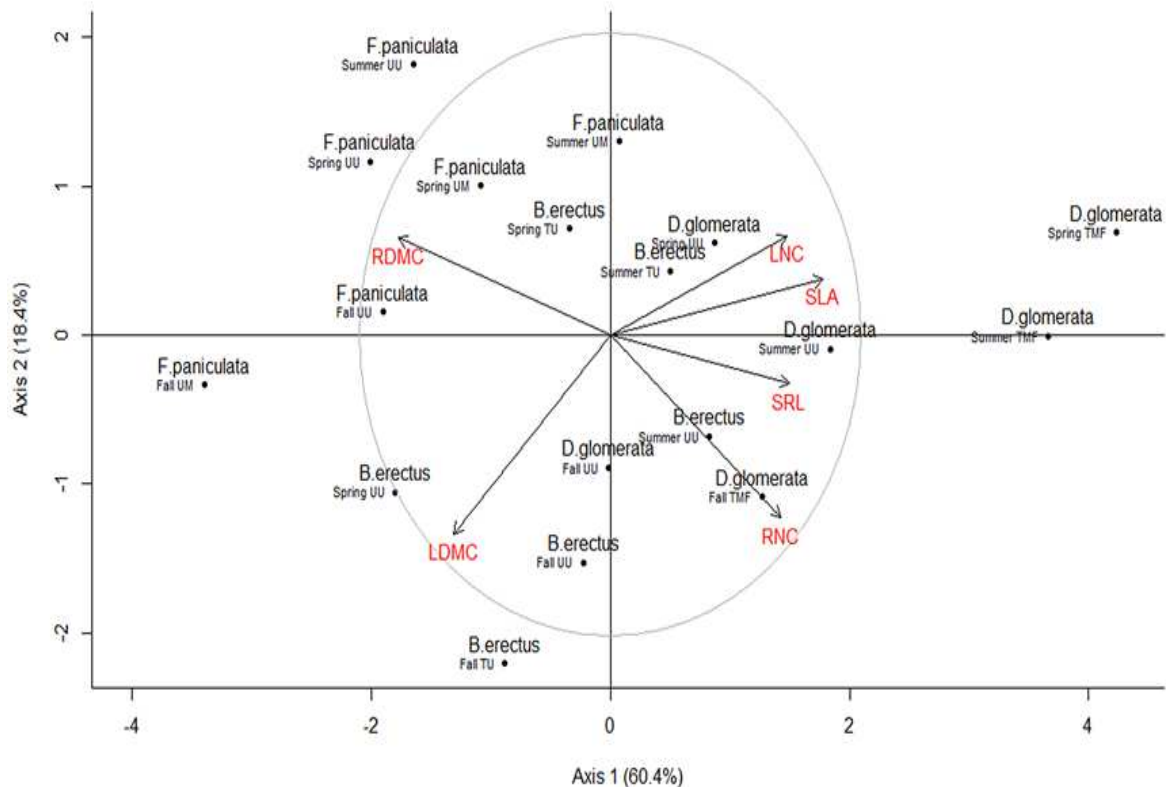


Figure 1. Principal components analysis (PCA) of functional traits measured for the leaves and roots of the three species, in each field during the growing season (spring, summer and autumn). SLA: Specific leaf area, LDMC: Leaf dry matter content, LNC: Leaf nitrogen content, SRL: Specific root length, RDMC: Root dry matter content, RNC: Root nitrogen content.

Among leaf and root traits, positive Pearson-pairwise correlation (Fig. 2) were observed for SLA and SRL with LNC and RNC respectively, while negative correlations were observed between LDMC and SLA or LNC, as well as for RDMC with SRL and LNC. We observed a significant positive correlation between SRL and SLA, but no correlation between LDMC and RDMC, or between LNC and RNC.

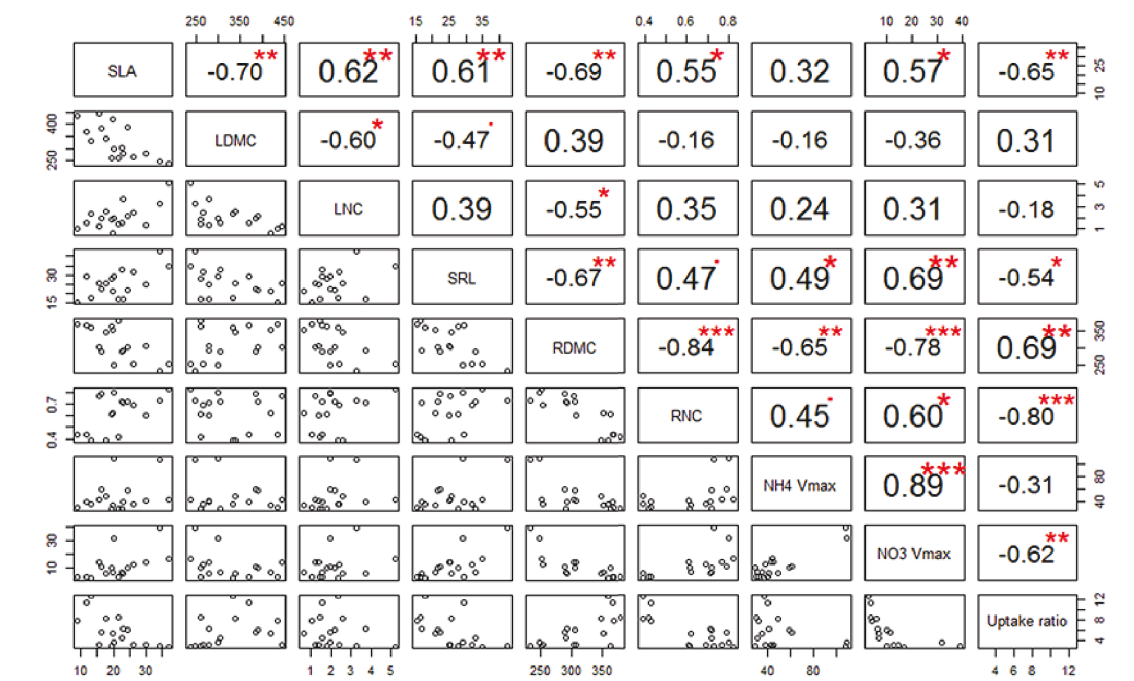


Figure 2. Pearson correlations between functional traits measured at the leaf (SLA, LDMC and LNC) and root (SRL, RDMC and RNC) levels, and plant nitrogen uptake parameters (V_{\max} for NO_3^- , NH_4^+ and the $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio). Stars indicate the significance level: *: <0.05 , **: <0.01 , ***: <0.001 .

Relationship between N uptake and functional traits

Multiple regressions (Table 1) between N uptake parameters and PCA axes indicated that functional trade-offs can significantly predict the uptake parameters. The models explained more variance for $\text{NO}_3^- V_{\max}$ and uptake ratio than for $\text{NH}_4^+ V_{\max}$.

Table 1. Linear model results for uptake parameters predicted by axes of the PCA on functional traits (Fig.1). For V_{\max} , the best model was the full model with the two axes interactions, while the best model for the uptake ratio was the additive model with the two axes.

Model	Multiple R-squared	p-value
$\text{NH}_4^+ V_{\max} \sim \text{axe1} * \text{axe2}$	0.4359	0.0113
$\text{NO}_3^- V_{\max} \sim \text{axe1} * \text{axe2}$	0.5722	.0018
$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- \text{ uptake ratio} \sim \text{axe1} + \text{axe2}$	0.5713	.0007

N uptake parameters were not correlated with leaf functional traits, except for SLA with $\text{NO}_3^- V_{\max}$ and with the $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ uptake ratio (Fig. 2). In contrast, they were significantly

correlated with root functional traits, especially with RDMC. NH_4^+ Vmax was positively correlated with NO_3^- Vmax, and the $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ uptake ratio was negatively correlated with NO_3^- Vmax but not NH_4^+ Vmax. All species were preferentially up taking NH_4^+ (greater NH_4^+ Vmax than NO_3^- Vmax) with $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ uptake ratios higher than 1 (Table 2).

Table 2. Uptake parameters for the three grass species, with mean values (\pm s.e.) calculated in two fields and at three different dates.

Species	Field	Time	NH_4^+ Vmax (nmol.g ⁻¹ .h ⁻¹)	NO_3^- Vmax (nmol.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ uptake ratio
<i>B. erectus</i>	TU	Spring	29.10 \pm 3.55	10.15 \pm 1.52	2.92 \pm 0.19
		Summer	43.15 \pm 3.01	14.35 \pm 1.50	3.08 \pm 0.31
		Autumn	44.52 \pm 4.63	14.41 \pm 1.65	3.23 \pm 0.49
	UU	Spring	35.05 \pm 4.93	6.67 \pm 0.64	5.32 \pm 0.65
		Summer	30.54 \pm 2.90	7.01 \pm 0.56	4.40 \pm 0.43
		Autumn	60.74 \pm 6.28	11.27 \pm 1.74	5.75 \pm 0.81
<i>D. glomerata</i>	TMF	Spring	43.94 \pm 13.54	16.78 \pm 4.33	2.77 \pm 0.85
		Summer	108.25 \pm 7.48	39.24 \pm 7.23	2.94 \pm 0.36
		Autumn	109.45 \pm 11.03	31.62 \pm 4.09	3.77 \pm 0.84
	UU	Spring	40.38 \pm 3.58	6.55 \pm 0.61	6.32 \pm 0.87
		Summer	37.60 \pm 3.33	12.54 \pm 2.70	3.42 \pm 0.64
		Autumn	58.39 \pm 7.47	9.97 \pm 0.85	5.97 \pm 0.84
<i>F. paniculata</i>	UM	Spring	48.92 \pm 4.12	6.05 \pm 0.59	8.40 \pm 1.10
		Summer	35.06 \pm 5.53	3.71 \pm 0.51	10.01 \pm 1.91
		Autumn	31.51 \pm 3.47	4.15 \pm 0.13	8.25 \pm 0.94
	UU	Spring	36.49 \pm 3.99	2.91 \pm 0.59	13.53 \pm 1.85
		Summer	30.01 \pm 2.13	3.60 \pm 0.34	8.41 \pm 0.34
		Autumn	39.89 \pm 1.95	3.52 \pm 0.41	11.71 \pm 1.18

Comparison of N uptake parameters between species and during the growing season

The first RDA axis was related to NH_4^+ and NO_3^- Vmax, and discriminated *D. glomerata* from *B. erectus* and *F. paniculata* (Fig. 3). These latter two species were separated along the second axis related to the $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ uptake ratio with higher values for *F. paniculata* than *B. erectus*, and *D. glomerata*.

Uptake parameters fluctuated during the growing season with lower uptake for *D. glomerata* and *B. erectus* during spring compared to autumn, or even summer in terraced sites (TMF and TU) (Fig. 3, Table 2). For *F. paniculata*, no such clear trend was observed except in UM sites with higher NH_4^+ and NO_3^- Vmax values in spring. For *D. glomerata*, Vmax values were lower in the UU grassland than in the TMF grassland, while only NO_3^- Vmax was lower for *B. erectus* in UU grassland when compared to the TU grassland (Fig. 3, Table 2). Scores along the first axis for the three species in the common grassland (UU) were also very similar, whereas some differences occurred along the second axis.

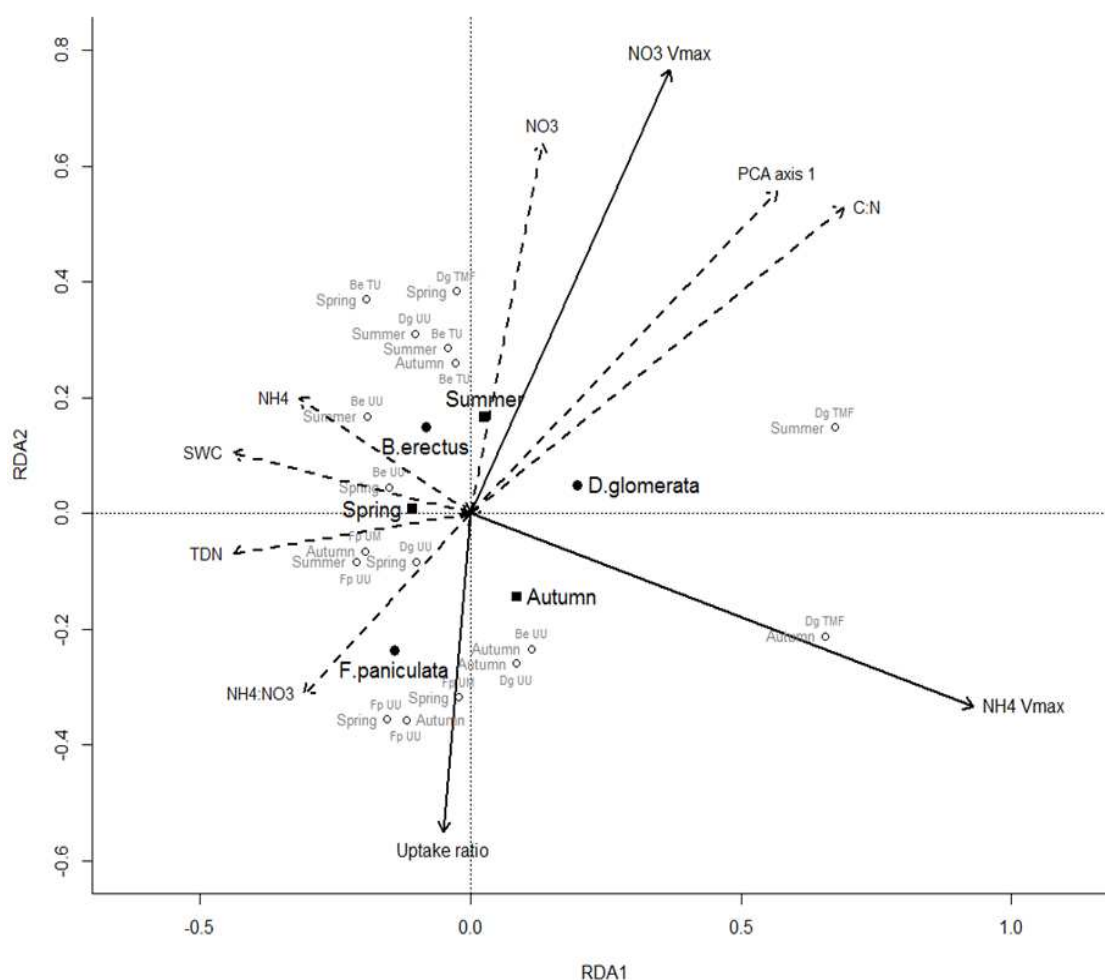


Figure 3. Redundancy analysis scores for the three species sampled in different fields during the growing season. Abbreviations: uptake parameters represented by solid arrows (NH_4^+ and NO_3^- Vmax, uptake ratio = $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ uptake ratio), soil parameters represented by dashed arrows (SWC: soil water content, TDN: Total dissolved nitrogen, NH_4^+ and NO_3^- contents, $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ = $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ soil ratio, C:N: soil C:N ratio). Squares represented the centroid mean for each sampling date; solid circles represented the centroid mean for each species.

Uptake parameters of species were partially related to soil properties of grasslands where species are abundant. The first axis of the RDA (Fig. 3, Table 3) was related to V_{max} for both N forms as well as to SWC, TDN and C: N in soil. The second axis was related to NO_3^- and to the $NH_4^+:NO_3^-$ ratio in soil, with coordinated variations between this last soil property and uptake ratio of species (Fig. 3).

Table 3. Soil properties (mean values \pm s.e.) for each grassland and at each of the three sampling dates. Na : not available because of a sampling issue. Nd : not detectable: under the level of sensitivity of the method, should be close from 0.

Field	Time	Soil water content (%)	pH	Soil organic matter (%)	C:N ratio	Total dissolved nitrogen ($\mu gN.g^{-1}$)	NH_4^+ ($\mu gN.g^{-1}$)	NO_3^- ($\mu gN.g^{-1}$)	$NH_4^+:NO_3^-$ ratio
TMF	Spring	51.96 \pm 3.53	7.91 \pm 0.06	16.57 \pm 2.16	12.37 \pm 0.30	93.92 \pm 2.63	21.74 \pm 2.63	3.76 \pm 1.62	8.50 \pm 4.76
	Summer	22.33 \pm 0.71	8.01 \pm 0.04	13.16 \pm 0.48	14.91 \pm 0.35	20.83 \pm 2.95	11.19 \pm 0.47	3.87 \pm 0.48	3.56 \pm 0.65
	Autumn	11.44 \pm 0.33	7.98 \pm 0.02	12.47 \pm 0.65	13.46 \pm 0.39	46.12 \pm 4.44	10.07 \pm 1.37	2.99 \pm 0.54	3.53 \pm 0.36
TU	Spring	39.57 \pm 1.53	8.01 \pm 0.04	13.03 \pm 0.71	12.73 \pm 0.28	65.98 \pm 2.64	15.77 \pm 2.16	8.35 \pm 1.20	1.95 \pm 0.37
	Summer	18.33 \pm 1.12	8.03 \pm 0.04	14.39 \pm 0.93	14.02 \pm 0.64	16.85 \pm 1.33	15.43 \pm 1.82	5.63 \pm 0.64	2.97 \pm 0.30
	Autumn	7.25 \pm 0.88	8.05 \pm 0.04	11.38 \pm 0.93	13.43 \pm 0.64	46.13 \pm 4.74	11.54 \pm 1.55	0.54 \pm 0.10	28.68 \pm 10.72
UM	Spring	44.87 \pm 3.30	5.90 \pm 0.06	16.19 \pm 0.80	11.34 \pm 0.17	76.25 \pm 10.84	12.99 \pm 2.47	0.23 \pm 0.10	59.30 \pm 3.91
	Summer	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Autumn	13.58 \pm 1.18	5.85 \pm 0.05	14.02 \pm 0.43	11.63 \pm 0.14	34.54 \pm 1.21	6.97 \pm 0.94	n.d.	n.d.
UU	Spring	49.72 \pm 1.94	6.27 \pm 0.15	18.12 \pm 1.15	11.14 \pm 0.27	82.12 \pm 11.23	22.11 \pm 5.88	1.04 \pm 0.35	25.40 \pm 9.51
	Summer	34.89 \pm 1.20	6.31 \pm 0.05	18.42 \pm 0.64	12.10 \pm 0.15	55.59 \pm 12.15	12.23 \pm 1.77	2.31 \pm 0.53	7.85 \pm 1.62
	Autumn	17.74 \pm 1.54	6.02 \pm 0.08	16.98 \pm 1.29	11.74 \pm 0.43	46.65 \pm 6.04	10.17 \pm 1.92	1.39 \pm 0.66	12.90 \pm 6.37

DISCUSSION

Leaf and root trade offs

Large efforts have been devoted to find relationships between leaf functional traits and their properties such as decomposability, respiration or photosynthesis efficiency (e.g. Reich *et al.* 1998, Wright *et al.* 2004, Cornwell *et al.* 2008). Similar approaches have been applied, to a lower extent, for roots and have led to similar patterns among root traits, with e.g. dry matter content or nitrogen concentration respectively positively and negatively related to longevity (Ryser & Lambers 1995, Reich *et al.* 1997, Craine *et al.* 2002), or water soluble compounds related to decomposability of fine roots (Birouste *et al.* 2012). In our study, we observed consistent patterns among leaf traits and among root traits (e.g. SLA with LNC, SRL with RDMC). Patterns for root traits followed the well described “economics spectrum” trade-off for leaves (Chapin 1980, Reich *et al.* 1997, Freschet *et al.* 2010).

Following the observation of similar patterns for leaf and root traits, the next step would be to detect coordinated variations between leaves and roots (Craine & Lee 2003, Tjoelker *et al.* 2005), but a recent review highlighted that non-coordinated variations could be observed across multiple growth forms (e.g. grasses and trees) and different environmental gradients (Freschet *et al.* 2010). Using species from a single growth form and similar habitats, we found limited evidence (only for SRL and SLA) of coordinated patterns of variations for leaf and root traits (Craine *et al.* 2001, Reich *et al.* 2003). Consistent patterns among leaf traits and root traits, but with a non-coordinated pattern between leaf and root traits, could result from different environmental constraints on above-ground and below-ground organs resulting from different selective pressures (Craine *et al.* 2005). Therefore, despite the fact that patterns among leaf and root traits can be related to analogous functions such as longevity or respiration (Reich *et al.* 2002, Tjoelker *et al.* 2005), each compartment can be also implied in independent processes such as light capture and photosynthesis for leaves, or anchoring to the ground and nutrient uptake for roots, so that selection can favour divergence between trait patterns for roots and leaves.

Link between functional traits and N uptake

Leaf functional traits have already been pointed out to be related to physiological processes described by ‘harder’ traits such as respiration, life span or photosynthetic N use efficiency (e.g. Reich *et al.* 1999, Wright *et al.* 2004, Poorter & Bongers 2006), but evidence for such

‘hard – soft’ trait relationships for root traits remain scarce (Ryser 1996, Reich *et al.* 2008, Maire *et al.* 2009). In our study, we considered the relationships between functional traits and nutrient uptake ability. Our results confirm the existence of such relationships between a leaf and root trait axis related to conservation and acquisition (PCA) and both nitrogen uptake (V_{max}) and preference between two inorganic N forms ($NH_4^+ : NO_3^-$ uptake ratio). Root traits appeared closely linked to nutrient uptake while only SLA showed significant relationships with N uptake parameters (Osone *et al.* 2008), with high values indicative of exploitative traits associated with higher N uptake and lower preference for NH_4^+ . More specifically, RDMC was significantly correlated with the three uptake parameters, with low RDMC (exploitative strategy) being associated with higher NH_4^+ and NO_3^- uptake rates and lower preference for ammonium compared to individuals with higher RDMC (conservative strategy).

Traits and N uptake patterns across species and environment

Nutrient uptake has received great attention as a parameter that could promote species coexistence, with niche partitioning across time, or for different chemical forms (Miller & Bowman 2002, Xu *et al.* 2011, Stahl *et al.* 2011). Our results did not fully support the hypothesis of a partitioning for different forms of N since all three species had higher uptake for NH_4^+ than for NO_3^- . This result is consistent with other studies demonstrating that species are likely to specialise on the most abundant resource in the soil that is NH_4^+ in our ecosystem as for most of alpine and arctic species (Schimel & Chapin 1996, Weigelt *et al.* 2005, Aanderud & Bledsoe 2009). However, the partitioning can be more subtle than a simple dichotomous choice between N forms and might be also sensitive to the relative abundance of these two forms. Species differed in their uptake efficiencies with higher uptake of both forms for *D. glomerata* which presents a more exploitative functional trait syndrome (Pornon *et al.* 2007, Ashton *et al.* 2008, Maire *et al.* 2009). Besides, the conservative species *F. paniculata* had lower uptake rates for both N forms and a higher $NH_4^+ : NO_3^-$ uptake ratio. In fact, this conservative plant species dominated untterraced grasslands with high soil $NH_4^+ : NO_3^-$ ratio (Robson *et al.* 2007, 2010). Conversely, *D. glomerata*, with an exploitative syndrome is dominant in grasslands with more even relative abundance of soil NO_3^- and NH_4^+ . Rather than a switch for different N forms, our results suggested the ability of species to express different uptake patterns depending on the relative availability of N forms (Houlton *et al.* 2007, Stahl *et al.* 2011, Xu *et al.* 2011) and this plasticity could also play an important role for speices coexistence (Ashton *et al.* 2010, Andersen & Turner 2013).

Another coexistence hypothesis has been proposed based on a time partitioning of N uptake between species (Jaeger *et al.* 1999, Stahl *et al.* 2011). Spring time was characterised by higher soil moisture (SWC) and N concentrations probably resulting from the microbial “crash” at snow melt (Brooks & Williams 1999; Lipson *et al.* 1999; Clément *et al.* 2012). Plant N uptake is usually hypothesized to be higher at this period and to decline during the growing season (Jaeger *et al.* 1999), even though vegetation still has low above-ground biomass, is exposed to freeze–thaw events that limit plant growth, and competes with microbes for N resources (Bardgett *et al.* 2002, Edwards *et al.* 2006, Edwards & Jefferies 2010). Only *F. paniculata*, whose geographic distribution naturally spans to higher elevations (up to 2400 m at the site) and is likely to be better adapted to snow free events, took up more N during spring while the other species had greater uptakes during summer and autumn. We hypothesise that plants from lower elevation ranges (i.e., *B. erectus* and *D. glomerata*) take up most of their required N later in the season when some aerial biomass have been produced, likely thanks to nutrient resorption which is a common phenomenon in harsh or poor environments (Aerts & Chapin 2000, Freschet *et al.* 2010), and when competition with microbes is lower than at snow melt (Lipson *et al.* 1999). Those species will thus benefit from available N resulting from faster N cycling at this period due to favourable soil parameters (Ledgard *et al.* 1998, Grogan & Jonasson 2003, Miller *et al.* 2009). Thus different patterns of N uptake between species during the growing season, but for a similar N form, could illustrate a mechanism allowing species coexistence *via* niche sharing across time (Jaeger *et al.* 1999, Stahl *et al.* 2001).

CONCLUSION:

Based on field measurements, we observed that the trade–off between nutrient acquisition and conservation can be reflected in root as well as in leaf traits. Despite the lack of correlation between analogous traits at the leaf and root levels (e.g. LNC and RNC), we observed analogous trade-offs across leaves and roots, as between dry matter contents and N concentrations. Moreover, functional traits of roots and leaves also captured species' N uptake ability, with higher N uptake and lower $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ uptake ratios associated with an exploitative trait syndrome. On the one hand, N uptake ability of plant species reflects their position along the economic spectrum. On the other hand, N uptake was also influenced by

variation in soil parameters resulting from management and from variations during the growing season that could modulate trait-driven uptake ability.

Acknowledgments

This study was conducted as part of ERA-Net BiodivERsA project VITAL, ANR-08-BDVA-008. The Lautaret site is part of the long-term research site Zone Atelier Alpes, a member of the ILTER-Europe and LTSER networks. We acknowledge the Joseph Fourier Alpine Research Station, -CNRS UMS 3370) for infrastructure support, Edith Primat and Marie-Pascale Colace for field assistance, and Marie-Paule Bataillé for isotopic analyses. The authors also thank the “Conseil Régional de Basse-Normandie” for the funding of a postdoctoral position to Fabrice Grassein.

References

- Aanderud, Z.T. & Bledsoe, C.S. (2009) Preferences for ^{15}N -ammonium, ^{15}N -nitrate, and ^{15}N -glycine differ among dominant exotic and subordinate native grasses from a California oak woodland. *Environmental and Experimental Botany*, **65**, 205–209.
- Aerts, R. & Chapin, F. (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research*, **30**, 1–67.
- Andersen, K.M. & Turner, B.J. (2013) Preferences or plasticity in nitrogen acquisition by understory palms in a tropical montane forest. *Journal of Ecology*, *in press*.
- Ashton, I.W., Miller, A.E., Bowman, W.D. & Suding, K.N. (2008) Nitrogen preferences and plant-soil feedbacks as influenced by neighbors in the alpine tundra. *Oecologia*, **156**, 625–636.
- Ashton, I.W., Miller, A.E., Bowman, W.D. & Suding, K.N. (2010) Niche complementarity due to plasticity in resource use: plant partitioning of chemical N forms. *Ecology*, **91**, 3252–3260.
- Baltzer, J.L. & Thomas, S.C. (2010) A second dimension to the Leaf Economics Spectrum predicts edaphic habitat association in a tropical forest. *PLoS ONE*, **5**, e13163.
- Bardgett, R.D., Bowman, W.D., Kaufmann, R. & Schmidt, S.K. (2005) A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 634–641.
- Bardgett, R.D., Streeter, T.C., Cole, L. & Hartley, I.R. (2002) Linkages between soil biota, nitrogen availability, and plant nitrogen uptake in a mountain ecosystem in the Scottish Highlands. *Applied Soil Ecology*, **19**, 121–134.
- Bello, F. de, Lavorel, S., Díaz, S., Harrington, R., Cornelissen, J.H.C., Bardgett, R.D., Berg, M.P., Cipriotti, P., Feld, C.K., Hering, D., Silva, P.M. da, Potts, S.G., Sandin, L., Sousa, J.P., Storkey, J., Wardle, D.A. & Harrison, P.A. (2010) Towards an assessment of multiple ecosystem processes and services via functional traits. *Biodiversity and Conservation*, **19**, 2873–2893.
- Birouste, M., Kazakou, E., Blanchard, A. & Roumet, C. (2012) Plant traits and decomposition: are the relationships for roots comparable to those for leaves? *Annals of Botany*, **109**, 463–472.
- Bloom, A.J. & Caldwell, R.M. (1988) Root excision decreases nutrient absorption and gas fluxes. *Plant Physiology*, **87**, 794–796.
- Bowman, W., Bahn, L. & Damm, M. (2003) Alpine Landscape Variation in Foliar Nitrogen

- and Phosphorus Concentrations and the Relation to Soil Nitrogen and Phosphorus Availability. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **35**, 144–149.
- Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G. & Jenkinson, D.S. (1985) Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **17**, 837–842.
- Brooks, P.D. & Williams, M.W. (1999) Snowpack controls on nitrogen cycling and export in seasonally snow-covered catchments. *Hydrological Processes*, **13**, 2177–2190.
- Chapin, F.S. (1980) The Mineral Nutrition of Wild Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 233–260.
- Chapin, F.S.I., Schulze, E.-D. & Mooney, H.A. (1990) The Ecology and Economics of Storage in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**, 423–447.
- Clement, J.C., Robson, T.M., Guillemin, R., Saccone, P., Lochet, J., Aubert, S. & Lavorel, S. (2012) The effects of snow-N deposition and snowmelt dynamics on soil-N cycling in marginal terraced grasslands in the French Alps. *Biogeochemistry*, **108**, 297–315.
- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., Reich, P.B., Steege, H. ter, Morgan, H.D., Heijden, M.G.A. van der, Pausas, J.G. & Poorter, H. (2003) A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.*, **51**, 335–380.
- Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Amatangelo, K., Dorrepaal, E., Eviner, V.T., Godoy, O., Hobbie, S.E., Hoorens, B., Kurokawa, H., Pérez-Harguindeguy, N., Qested, H.M., Santiago, L.S., Wardle, D.A., Wright, I.J., Aerts, R., Allison, S.D., Van Bodegom, P., Brovkin, V., Chatain, A., Callaghan, T.V., Díaz, S., Garnier, E., Gurvich, D.E., Kazakou, E., Klein, J.A., Read, J., Reich, P.B., Soudzilovskaia, N.A., Vaieretti, M.V. & Westoby, M. (2008) Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. *Ecology Letters*, **11**, 1065–1071.
- Craine, J.M., Froehle, J., Tilman, D.G., Wedin, D.A. & Chapin, I.I.I. (2001) The relationships among root and leaf traits of 76 grassland species and relative abundance along fertility and disturbance gradients. *Oikos*, **93**, 274–285.
- Craine, J.M. & Lee, W.G. (2003) Covariation in leaf and root traits for native and non-native grasses along an altitudinal gradient in New Zealand. *Oecologia*, **134**, 471–478.
- Craine, J.M., Lee, W.G., Bond, W.J., Williams, R.J. & Johnson, L.C. (2005) Environmental constraints on a global relationship among leaf and root traits of grasses. *Ecology*, **86**, 12–19.

- Craine, J.M., Tilman, D., Wedin, D., Reich, P., Tjoelker, M. & Knops, J. (2002) Functional traits, productivity and effects on nitrogen cycling of 33 grassland species. *Functional Ecology*, **16**, 563–574.
- Diaz, S., Hodgson, J.G., Thompson, K., Cabido, M., Cornelissen, J.H., Jalili, A., Montserrat-Martí, G., Grime, J.P., Zarrinkamar, F., Asri, Y., Band, S.R., Basconcelo, S., Castro-Díez, P., Funes, G., Hamzehee, B., Khoshnevi, M., Pérez-Harguindeguy, N., Pérez-Rontomé, M.C., Shirvany, F.A., Vendramini, F., Yazdani, S., Abbas-Azimi, R., Bogaard, A., Boustani, S., Charles, M., Dehghan, M., Torres-Espuny, L., Falczuk, V., Guerrero-Campo, J., Hynd, A., Jones, G., Kowsary, E., Kazemi-Saeed, F., Maestro-Martínez, M., Romo-Díez, A., Shaw, S., Siavash, B., Villar-Salvador, P. & Zak, M.R. (2004) The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science*, **15**, 295–304.
- Edwards, K.A. & Jefferies, R.L. (2010) Nitrogen uptake by *Carex aquatilis* during the winter–spring transition in a low Arctic wet meadow. *Journal of Ecology*, **98**, 737–744.
- Edwards, K.A., McCulloch, J., Peter Kershaw, G. & Jefferies, R.L. (2006) Soil microbial and nutrient dynamics in a wet Arctic sedge meadow in late winter and early spring. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 2843–2851.
- Falkengren-Grerup, U., Michelsen, A., Olsson, M.O., Quarmby, C. & Sleep, D. (2004) Plant nitrate use in deciduous woodland: the relationship between leaf N, ^{15}N natural abundance of forbs and soil N mineralisation. *Soil Biology and Biochemistry*, **36**, 1885–1891.
- Freschet, G.T., Cornelissen, J.H.C., Van Logtestijn, R.S.P. & Aerts, R. (2010) Evidence of the “plant economics spectrum” in a subarctic flora. *Journal of Ecology*, **98**, 362–373.
- Götzenberger, L., de Bello, F., Bråthen, K.A., Davison, J., Dubuis, A., Guisan, A., Lepš, J., Lindborg, R., Moora, M., Pärtel, M., Pellissier, L., Pottier, J., Vittoz, P., Zobel, K. & Zobel, M. (2012) Ecological assembly rules in plant communities—approaches, patterns and prospects. *Biological Reviews*, **87**, 111–127.
- Grassein, F., Till-Bottraud, I. & Lavorel, S. (2010) Plant resource-use strategies: the importance of phenotypic plasticity in response to a productivity gradient for two subalpine species. *Annals of Botany*, **106**, 637–645.
- Grogan, P. & Jonasson, S. (2003) Controls on Annual Nitrogen Cycling in the Understory of a Subarctic Birch Forest. *Ecology*, **84**, 202–218.
- Gross, N., Suding, K.N. & Lavorel, S. (2007) Leaf dry matter content and lateral spread

- predict response to land use change for six subalpine grassland species. *Journal of Vegetation Science*, **18**, 289.
- Houlton, B.Z., Sigman, D.M., Schuur, E.A.G. & Hedin, L.O. (2007) A climate-driven switch in plant nitrogen acquisition within tropical forest communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 8902–8906.
- Jaeger, C.H., Monson, R.K., Fisk, M.C. & Schmidt, S.K. (1999) Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. *Ecology*, **80**, 1883–1891.
- Kahmen, A., Livesley, S.J. & Arndt, S.K. (2009) High potential, but low actual, glycine uptake of dominant plant species in three Australian land-use types with intermediate N availability. *Plant and Soil*, **325**, 109–121.
- Lavorel, S. (2013) Plant functional effects on ecosystem services. *Journal of Ecology*, **101**, 4–8.
- Lavorel, S., McIntyre, S., Landsberg, J. & Forbes, T.D.A. (1997) Plant functional classifications: from general groups to specific groups based on response to disturbance. *Trends in Ecology & Evolution*, **12**, 474–478.
- Ledgard, S.F., Jarvis, S.C. & Hatch, D.J. (1998) Short-term nitrogen fluxes in grassland soils under different long-term nitrogen management regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**, 1233–1241.
- Léon, M., Lainé, P., Ourry, A. & Boucaud, J. (1995) Increased uptake of native soil nitrogen by roots of *Lolium multiflorum* Lam. after nitrogen fertilization is explained by a stimulation of the uptake process itself. *Plant and Soil*, **173**, 197–203.
- Lipson, D.A., Schmidt, S.K. & Monson, R.K. (1999) Links between microbial population dynamics and nitrogen availability in an alpine ecosystem. , 1623–1631.
- Louahlia, S., Lainé, P., Thornton, B., Ourry, A. & Boucaud, J. (2000) The role of N-remobilisation and the uptake of NH_4^+ and NO_3^- by *Lolium perenne* L. in laminae growth following defoliation under field conditions. *Plant and Soil*, **220**, 175–187.
- Lucash, M.S., Eissenstat, D.M., Joslin, J.D., McFarlane, K.J. & Yanai, R.D. (2007) Estimating nutrient uptake by mature tree roots under field conditions: challenges and opportunities. *Trees*, **21**, 593–603.
- Maire, V., Gross, N., Da Silveira Pontes, L., Picon-Cochard, C. & Soussana, J. (2009) Trade-off between root nitrogen acquisition and shoot nitrogen utilization across 13 co-occurring pasture grass species. *Functional Ecology*, **23**, 668–679.
- McKane, R.B., Johnson, L.C., Shaver, G.R., Nadelhoffer, K.J., Rastetter, E.B., Fry, B.,

- Giblin, A.E., Kielland, K., Kwiatkowski, B.L., Laundre, J.A. & Murray, G. (2002) Resource-based niches provide a basis for plant species diversity and dominance in arctic tundra. *Nature*, **415**, 68–71.
- Miller, A. & Bowman, W. (2002) Variation in nitrogen-15 natural abundance and nitrogen uptake traits among co-occurring alpine species: do species partition by nitrogen form? *Oecologia*, **130**, 609–616.
- Miller, A.E., Schimel, J.P., Sickman, J.O., Skeen, K., Meixner, T. & Melack, J.M. (2009) Seasonal variation in nitrogen uptake and turnover in two high-elevation soils: mineralization responses are site-dependent. *Biogeochemistry*, **93**, 253–270.
- Osone, Y., Ishida, A. & Tatenos, M. (2008) Correlation between relative growth rate and specific leaf area requires associations of specific leaf area with nitrogen absorption rate of roots. *New Phytologist*, **179**, 417–427.
- Osone, Y. & Tatenos, M. (2005) Nitrogen absorption by roots as a cause of interspecific variations in leaf nitrogen concentration and photosynthetic capacity. *Functional Ecology*, **19**, 460–470.
- Poorter, L. & Bongers, F. (2006) Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. *Ecology*, **87**, 1733–1743.
- Pornon, A., Escaravage, N. & Lamaze, T. (2007) Complementarity in mineral nitrogen use among dominant plant species in a subalpine community. *American Journal of Botany*, **94**, 1778–1785.
- Quétier, F., Thébaud, A. & Lavorel, S. (2007) Plant traits in a state and transition framework as markers of ecosystem response to land-use change. *Ecological Monographs*, **77**, 33–52.
- Reich, P.B., Ellsworth, D.S., Walters, M.B., Vose, J.M., Gresham, C., Volin, J.C. & Bowman, W.D. (1999) Generality of Leaf Trait Relationships: A Test Across Six Biomes. *Ecology*, **80**.
- Reich, P.B., Tjoelker, M.G., Pregitzer, K.S., Wright, I.J., Oleksyn, J. & Machado, J.-L. (2008) Scaling of respiration to nitrogen in leaves, stems and roots of higher land plants. *Ecology Letters*, **11**, 793–801.
- Reich, P.B., Walters, M.B. & Ellsworth, D.S. (1997) From tropics to tundra: Global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 13730–13734.
- Reich, P.B., Wright, I.J., Cavender-Bares, J., Craine, J.M., Oleksyn, J., Westoby, M. & Walters, M.B. (2003) The evolution of plant functional variation: Traits, spectra, and

- strategies. *International journal of plant sciences*, **164**, S143–S164.
- Robson, T.M., Baptist, F., Clément, J. & Lavorel, S. (2010) Land use in subalpine grasslands affects nitrogen cycling via changes in plant community and soil microbial uptake dynamics. *Journal of Ecology*, **98**, 62–73.
- Robson, T.M., Lavorel, S., Clement, J.-C. & Roux, X.L. (2007) Neglect of mowing and manuring leads to slower nitrogen cycling in subalpine grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 930–941.
- Roumet, C., Urcelay, C. & Díaz, S. (2006) Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytologist*, **170**, 357–368.
- Ryser, P. (1996) The Importance of Tissue Density for Growth and Life Span of Leaves and Roots: A Comparison of Five Ecologically Contrasting Grasses. *Functional Ecology*, **10**, 717–723.
- Ryser, P. & Lambers, H. (1995) Root and leaf attributes accounting for the performance of fast- and slow-growing grasses at different nutrient supply. *Plant and Soil*, **170**, 251–265.
- Schimel, J.P. & Chapin, F.S. (1996) Tundra Plant Uptake of Amino Acid and NH_4^+ Nitrogen in Situ: Plants Complete Well for Amino Acid N. *Ecology*, **77**, 2142–2147.
- Stahl, V.M., Beyschlag, W. & Werner, C. (2011) Dynamic niche sharing in dry acidic grasslands -a ^{15}N -labeling experiment. *Plant and Soil*, **344**, 389–400.
- Tilman, D. (1994) Competition and Biodiversity in Spatially Structured Habitats. *Ecology*, **75**, 2–16.
- Tjoelker, M.G., Craine, J.M., Wedin, D., Reich, P.B. & Tilman, D. (2005) Linking leaf and root trait syndromes among 39 grassland and savannah species. *New Phytologist*, **167**, 493–508.
- Weigelt, A., Bol, R. & Bardgett, R.D. (2005) Preferential uptake of soil nitrogen forms by grassland plant species. *Oecologia*, **142**, 627–635.
- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A. & Wright, I.J. (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 125–159.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P.K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J.J., Navas, M.-L., Niinemets, U., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V.I., Roumet, C., Thomas, S.C., Tjoelker, M.G., Veneklaas, E.J. & Villar, R.

(2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, **428**, 821–827.

Xu, X., Ouyang, H., Cao, G., Richter, A., Wanek, W. & Kuzyakov, Y. (2011) Dominant plant species shift their nitrogen uptake patterns in response to nutrient enrichment caused by a fungal fairy in an alpine meadow. *Plant and Soil*, **341**, 495–504.

Conclusion du chapitre 6

Ces deux dernières expérimentations *in situ* mettent en évidence une variation saisonnière de la dynamique de l'azote (N) inorganique dans les prairies subalpines. D'une part en ce qui concerne les patrons d'absorption des différentes espèces végétales, et d'autre part entre l'ensemble de la communauté végétale et les communautés microbiennes du sol.

L'étude comparant les taux d'absorption de NH_4^+ et de NO_3^- chez trois espèces caractérisées par des utilisations contrastées des ressources (*Festuca paniculata*, *Bromus erectus* et *Dactylis glomerata*) avait pour objectif de déterminer les traits fonctionnels végétaux marqueurs de ces capacités d'absorption (Grassein *et al.*, soumis à *Journal of Ecology*). A travers nos mesures, nous observons les mêmes corrélations négatives entre les traits foliaires ou entre les traits racinaires (SLA avec LNC ou SRL avec RDMC), ce qui soutient l'idée que les traits racinaires suivent le même compromis dans leur spectre d'économie des nutriments que ceux décrit pour les traits foliaires. Cependant, nous avons également montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre les traits racinaires et les traits foliaires des espèces étudiées, ce qui confirme l'existence d'une dichotomie entre les deux types d'organes. Néanmoins, nos résultats ont révélé qu'un des traits foliaires (SLA) ainsi que les traits racinaires (RDMC, RNC) étaient reliés avec les paramètres d'absorption de l'N ($V_{\text{max NO}_3^-}$ et $V_{\text{max NH}_4^+}$), confirmant ainsi la complémentarité entre les traits fonctionnels foliaires et racinaires mis en évidence dans les chapitres précédents. Enfin, nous avons montré que les trois espèces étudiées possèdent des capacités d'absorption supérieures pour l'ammonium comparativement au nitrate, confirmant les observations faites en conditions hydroponiques (Grassein *et al.*, soumis à *Functional Ecology*). Ces capacités d'absorption semblaient modulées par la disponibilité en nutriments dans le sol puisque l'intensité d'absorption des différentes formes d'N inorganique par les plantes était fonction des quantités présentes dans les sols de chaque prairie lors des différentes dates de mesures (Fig. 1). Cependant, ces résultats restent à confirmer sur une gamme d'espèces plus large ainsi que pour d'autres types d'écosystèmes que les prairies subalpines.

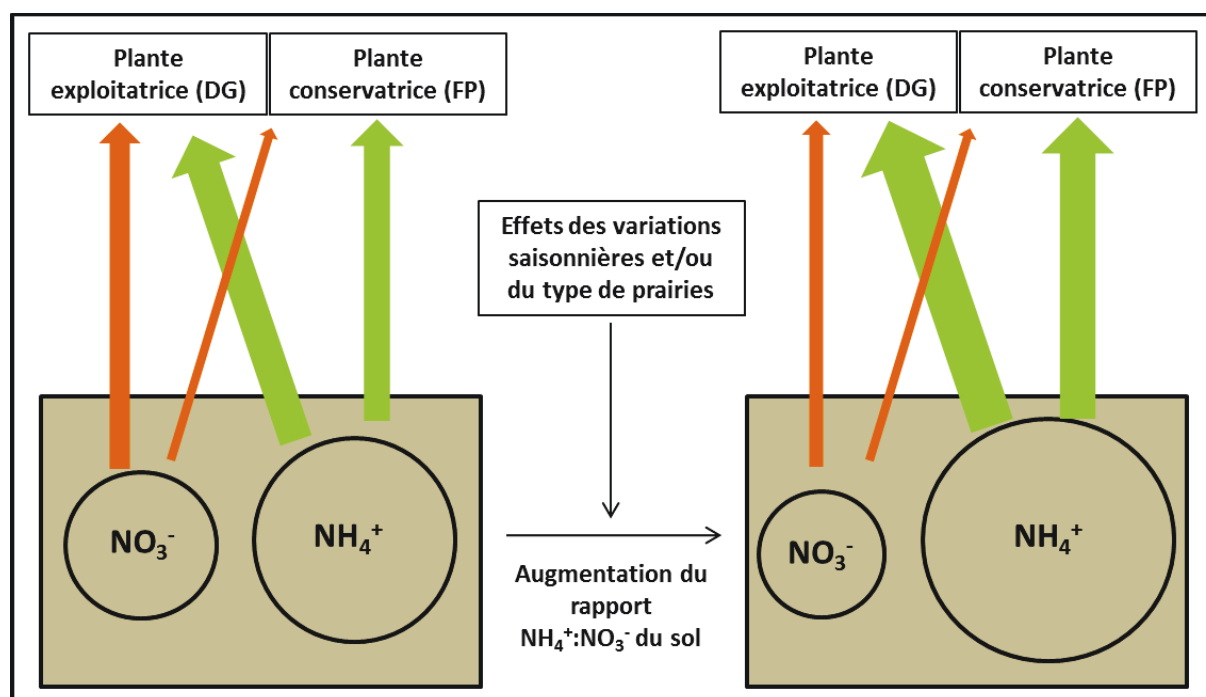


Figure 1. Schéma représentant l'influence du type de prairies et des variations saisonnières sur la disponibilité de l'ammonium (NH_4^+) et du nitrate (NO_3^-) dans le sol, et sur les patrons d'acquisition de l'ammonium et du nitrate chez deux des espèces étudiées. La taille des cercles est proportionnelle au pool disponible de nutriments. La taille des flèches (orange et vertes) est proportionnelle aux capacités d'absorption des formes d'azote. L'absorption du nitrate et de l'ammonium est toujours plus importante chez l'espèce la plus exploitatrice mais la quantité d'ammonium absorbée par rapport à celle du nitrate est supérieure chez l'espèce la plus conservatrice. Légendes : *Dactylis glomerata* (DG) et *Festuca paniculata* (FP).

La seconde étude (Legay *et al.*, soumis à Biogeosciences) a déterminé les flux d'N inorganique (DIN - dissolved inorganic nitrogen) entre les communautés végétales et les communautés microbiennes du sol dans quatre types de prairies subalpines différant par leur mode de gestion. Ces résultats ont été comparés à une étude précédemment réalisée sur les mêmes sites mais au cours du pic de végétation (Robson *et al.*, 2010). Nous avons montré qu'à l'échelle de l'individu (par gramme de biomasse), les plantes présentaient des capacités d'absorption supérieures à la fonte des neiges par rapport au pic végétation, alors que celles des microorganismes restaient identiques. A l'échelle du mètre carré permettant d'estimer la compétition entre les plantes et les microorganismes, nos résultats ont révélé que les communautés végétales absorbaient plus de d'azote inorganique dissous (DIN) que les microorganismes du sol à la fonte des neiges, alors que l'opposé avait été observé au pic de biomasse. Ce premier constat souligne le fait qu'au cours d'une même saison de végétation, les relations de compétition pour le DIN entre les communautés végétales et microbiennes peuvent s'inverser. Ces observations sont également importantes si l'on replace cette étude

dans le cadre du fonctionnement des écosystèmes. Les contributions relatives des plantes et des microorganismes du sol aux différentes propriétés écosystémiques démontrées en mésocosmes (chapitre 4) ou *in situ* (chapitre 5) sont susceptibles de radicalement changer selon la saison considérée. Par exemple, le compromis entre lessivage et rétention de nutriments que nous avons démontré comme étant contrôlé majoritairement par les microorganismes du sol (chapitre 5) pourraient se trouver modifié à la fonte des neiges. Par conséquent, l'incorporation des dynamiques temporelles des relations plantes-microorganismes permettrait d'améliorer notre compréhension à la fois sur ces relations et sur le fonctionnement générale de l'écosystème subalpin.

Bien que cette seconde étude ait apporté un niveau de compréhension supplémentaire à l'échelle locale sur notre site d'étude, elle contribue également à nous poser d'autres questions notamment sur les communautés microbiennes du sol. En effet, même si les capacités d'acquisition du DIN diminuent fortement sur toutes les prairies étudiées au moment de la fonte, nous avons observé deux réponses différentes de la biomasse microbienne azotée (MBN – microbial biomass N) selon le type de prairies considéré. Sur les prairies terrassées, la MBN reste stable au cours de la saison tout comme son rapport carbone : azote (C :N), alors que sur les prairies de pentes la MBN augmente et son C :N diminue entre la fin de la fonte des neiges et le pic de biomasse. Ces deux résultats suggèrent :

- soit une utilisation d'une autre source d'N que le DIN (probablement l'azote organique, reconnu comme une source d'N utilisée par les microorganismes du sol) par les microorganismes du sol leur permettant d'augmenter ou de maintenir une MBN stable.
- soit par la présence sur les prairies terrassées de communautés microbiennes résistant au cycle de gel/dégel, et en état de quiescence c'est-à-dire sans activité d'absorption de DIN.
- soit par la présence sur les prairies de pente de communautés microbiennes protéolytiques consommant préférentiellement l'azote organique et caractérisées par un fort C:N.

Pour préciser ces pistes, des expérimentations supplémentaires devraient être mises en place pour comprendre les changements de ces communautés microbiennes. Par exemple, des mesures de flux d'azote organique par marquage au ^{15}N d'acides aminés permettrait d'élucider l'éventuelle utilisation de cette ressource par la végétation. D'autre part, la dynamique et le turn-over des communautés microbiennes présentes dans le sol par un séquençage ADN sont à envisager.

Discussion générale

Discussion générale

Bien qu'étant reconnues comme ayant une influence sur le fonctionnement et les propriétés de l'écosystème, les relations plantes-microorganismes restent encore mal comprises. Les connaissances de la communauté scientifique se sont en effet concentrées sur les aspects de compétition pour les ressources, et notamment pour l'N (Kaye & Hart, 1997; Miller et Bowman, 2003 ; Harrison *et al.*, 2008), ainsi que sur les relations symbiotiques bactériennes et mycorhiziennes (Cleveland *et al.*, 1999 ; van der Heijden *et al.*, 2006). Mais de ces études, aucun trait fonctionnel végétal descriptif et/ou prédicteur des relations entre ces deux composantes de l'écosystème n'a été mis en évidence, excepté les traits liés à la disponibilité des nutriments du milieu pour les plantes et les stratégies qu'elles emploient pour acquérir et utiliser les ressources (Robinson *et al.*, 1999 ; Lavorel & Garnier, 2002 ; Maire *et al.*, 2009 ; Garnier & Navas, 2012). De même, les résultats majeurs sur les études des paramètres fonctionnels microbiens ont révélé généralement une réponse des microorganismes du sol aux conditions du milieu (Bardgett *et al.*, 2001; Leininger *et al.*, 2006 ; Eskelinen *et al.*, 2009 ; Bannert *et al.*, 2011). Ces études ont montré que la disponibilité des différentes formes d'N du milieu, et notamment les formes inorganiques (NO_3^- , NH_4^+) pouvaient influencer les interactions compétitives entre les plantes et les microorganismes du sol. Outre, cet aspect de compétition pour les ressources, la plupart des autres études sur les relations entre les plantes et les microorganismes du sol ont eu comme objectif de déterminer l'influence de la litière végétale (Wardle, 1992) et de l'exsudation racinaire (Griffiths *et al.*, 1999) sur les communautés microbiennes du sol. Les conclusions tirées d'une majorité de ces études sont que la quantité et les traits relatifs à la qualité (rapport C :N) de la litière et des exsudats ont pour impact majeur d'influencer la vitesse de recyclage des nutriments (Aerts, 1999 ; De Deyn *et al.*, 2008), la minéralisation de la matière organique du sol (Kuzyakov, 2006 ; Kuzyakov & Xu, 2013) et la composition de la communauté microbienne du sol (Van der kift *et al.*, 2001 ; Eskelinen *et al.*, 2009). Cependant, les résultats de la plupart de ces études sont difficiles à extrapoler pour les écosystèmes *in natura*, du fait qu'elles se soient concentrées le plus souvent sur une seule espèce végétale ou sur des communautés artificielles, et non sur des mesures *in situ* dans des communautés végétales avec la prise en compte de leurs cortèges de traits fonctionnels. Les quelques travaux *in situ* sur les effets des traits fonctionnels végétaux sur les microorganismes du sol ont analysé soit

les effets des traits foliaires seuls (Laughlin *et al.*, 2011; De Vries *et al.*, 2012), soit des traits racinaires seuls (Valé *et al.*, 2005; Pohl *et al.*, 2011). L'une des études les plus récentes ayant travaillé à la fois sur les traits végétaux aériens et souterrains a montré d'une part que ces deux types de traits étaient relativement indépendants et d'autre part qu'ils avaient tous deux des effets sur la composition des communautés microbiennes (Orwin *et al.*, 2010). **J'ai comme dans cette étude fondé mes recherches sur le constat que l'impact des traits fonctionnels végétaux sur les paramètres fonctionnels microbiens devait être estimé à travers des mesures simultanées sur les traits foliaires et racinaires, et que les liens potentiels entre ces traits et les communautés microbiennes devaient être confirmés par des études au champ.**

Ainsi, bien que critiquables dans le cas où les résultats ne sont pas confirmés au champ, nous avons mis en place une succession d'expérimentations afin de créer un gradient de contrôle des conditions abiotiques et biotiques (Fig. 1). Ce système nous a permis d'identifier les traits fonctionnels végétaux, aériens et racinaires, liés aux paramètres fonctionnels microbiens, ainsi que les effets de leurs interactions sur les processus écosystémiques.

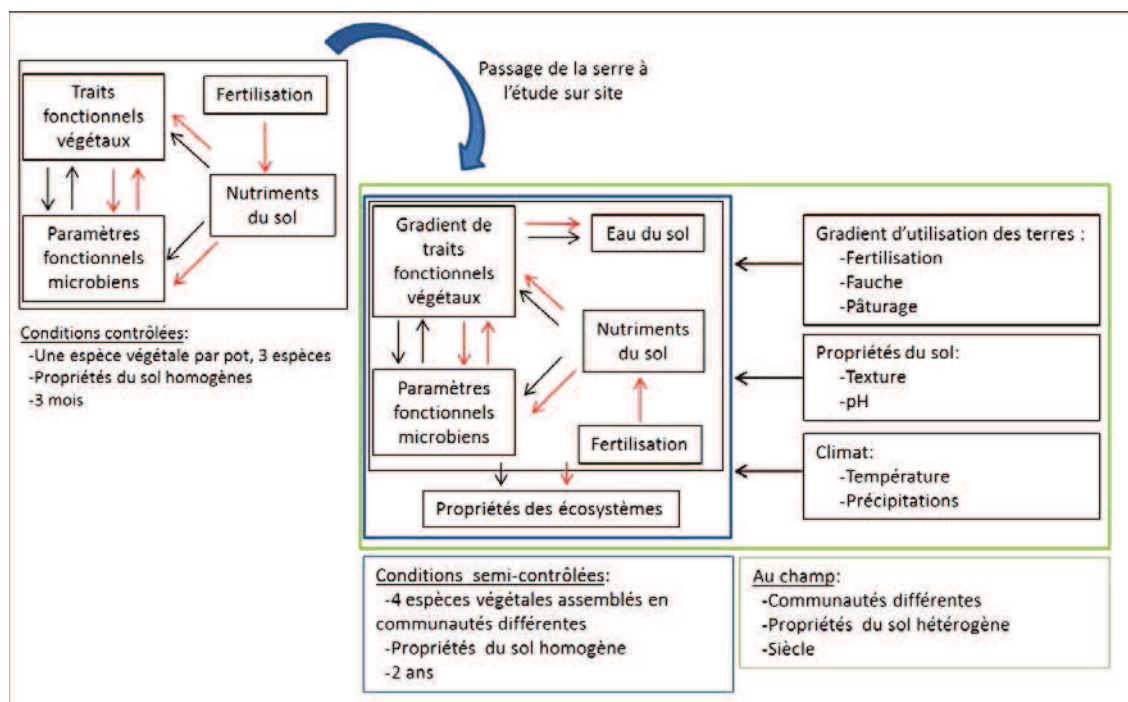


Figure 1 : Schéma représentant la complexification des systèmes d'étude par diminution du contrôle des variables abiotiques, augmentation du temps d'expérimentation et de la gamme de traits fonctionnels végétaux. Les couleurs de flèches symbolisent les deux conditions de disponibilité de l'azote mise en place en conditions contrôlées (sans (noires) ou avec ajout d'azote (rouges)).

Dans la discussion qui suit, je vais discuter de la stratégie expérimentale mise en place pour mes travaux de recherche, et qui m'a permis d'obtenir ces résultats. Ensuite, je discuterai des principaux résultats et des conclusions déduites des différentes expérimentations. J'aborderai après les avantages et les limites de l'utilisation des traits fonctionnels végétaux pour comprendre les relations plantes-microorganismes avant de discuter des limites de mon étude. Enfin, je conclurai ma discussion par les perspectives de recherches qui découlent de mes travaux.

1. Les expérimentations emboîtées : des mécanismes fins des relations plantes-microorganismes aux interactions à l'échelle de l'écosystème

La mise en place d'expérimentations qui intègrent de plus en plus de variables abiotiques, tout en augmentant la diversité des variables biotiques, a été l'un des atouts majeurs de mes recherches. En effet, en limitant les variations des propriétés du sol, reconnues parmi les facteurs majeurs influençant les communautés végétales et microbiennes (Grime, 1977 ; Le Roux *et al.*, 2008), j'ai pu identifier les traits fonctionnels végétaux liés aux paramètres fonctionnels des communautés microbiennes du sol. La fixation du compartiment « sol » (par tamisage/homogénéisation) avait pour objectif principal de limiter l'hétérogénéité de ses propriétés (texture, pH et humidité) pour se concentrer sur les mécanismes fins impliqués dans les relations entre traits fonctionnels végétaux et communautés microbiennes du sol.

Cette approche fut idéale pour utiliser des méthodes non applicables au champ tel qu'une stérilisation complète du sol pour réinitialiser toutes les communautés microbiennes ou un marquage isotopique au ^{13}C sur une longue période. La stérilisation nous a servi à observer les variations de traits fonctionnels végétaux en présence ou en absence de communautés microbiennes. De même, l'utilisation des résultats de l'expérimentation mise en place par Florence Baptiste m'a aidé à comprendre les mécanismes fins des relations entre les plantes et les microorganismes. En effet, cette expérimentation consistant en un marquage isotopique sur une longue période (78 jours) avait pour objectif d'instaurer un flux continu de ^{13}C des racines vers le sol pour quantifier à la fois le C perdu (exsudation et respiration des racines) et le C assimilé et respiré par les microorganismes du sol. Enfin, les espèces étudiées

présentaient une gamme de valeurs de traits fonctionnels le long du spectre d'économie d'utilisation des ressources (Freschet *et al.*, 2010 ; Grassein *et al.*, soumis) (dans la limite de la gamme couverte par les prairies de montagne), afin d'obtenir des interactions contrastées avec les microorganismes du sol. De cette manière, des traits fonctionnels végétaux potentiellement indicateurs des relations plantes-microorganismes du sol ont été identifiés, tels que les traits chimiques racinaires. Bien que comportant certains biais (taille du système, durée de l'expérience), cette étape est indispensable si l'on veut être capable de relier des traits fonctionnels végétaux à des processus biologiques dans le cadre d'étude sur le fonctionnement et les propriétés des écosystèmes.

L'expérimentation en mésocosme s'est déroulée sur une période de deux ans et a constitué un degré supérieur de complexification et de complémentarité par rapport à l'étude en pots. D'une part, c'est une manipulation réalisée *in situ* avec les conditions climatiques locales (température, précipitation, ensoleillement,...) dans lesquelles se développent les espèces végétales modèles que nous avons étudiées. D'autre part, le même sol a été utilisé (prairies à *F. paniculata*) dans l'objectif de limiter certaines variations des propriétés du sol (texture, pH, concentration en nutriment), laissant cependant une variable s'exprimer par rapport à l'expérimentation en pot : la disponibilité en eau du sol. Ce dispositif nous apporta surtout l'avantage de pouvoir moduler la distribution des espèces étudiées au sein de communautés artificielles (Hooper *et al.*, 2005) afin non plus d'obtenir trois points répartis dans le spectre d'économie des ressources mais un gradient de traits fonctionnels. De plus, ce gradient de traits fonctionnels a été augmenté en mettant en place cette expérience sur deux autres sites en Europe, avec un sol et des espèces végétales propres à ces sites. Enfin, le mésocosme étant par définition un écosystème simplifié, nous en avons mesuré les propriétés telles que la production de biomasse végétale ou le lessivage des nutriments. Nous avons ainsi pu déterminer dans chacune des trois composantes étudiées de l'écosystème (sol, plantes et microorganismes), et de leurs interactions, celles expliquant le plus la variation du fonctionnement de ces écosystèmes simplifiés.

Les études au champ constituent l'échelle la plus complexe notamment du fait que toutes les propriétés du sol ne sont plus contrôlées et varient d'un type de prairie, ou d'une parcelle, à l'autre. Cette échelle de travail permet donc d'intégrer l'ensemble des effets des propriétés abiotiques telles que le climat, le pH, la texture du sol ou la disponibilité des nutriments. Nous avons opté pour un échantillonnage sur une gamme de types d'utilisation des terres qui induit une gamme de propriétés édapho-climatiques, et un gradient de traits fonctionnels végétaux et de paramètres fonctionnels microbiens. De la même manière que pour l'expérimentation en

mésocosme, la répétition de l'étude sur trois sites en Europe a permis d'augmenter l'amplitude de ces gradients de traits végétaux, de paramètres microbiens et de propriétés du sol. A travers les observations faites *in situ*, nous avons d'une part vérifié si les traits fonctionnels végétaux identifiés comme marqueurs des relations plantes-microbes en conditions contrôlées étaient les mêmes au champ. D'autre part, nous avons vérifié la part relative de la contribution des traits fonctionnels végétaux et des paramètres fonctionnels microbiens aux variations d'une gamme de propriétés des écosystèmes associées au cycle de l'N. Enfin, les études *in situ* ont montré une dynamique spatio-temporelle de l'N entraînant des variations dans les patrons d'absorption des espèces étudiées ainsi qu'un changement des flux d'N entre les communautés végétales et les microorganismes. Cependant, ces deux dernières expérimentations (Grassein *et al.*, soumis à *Journal of Ecology*; Legay *et al.*, soumis à *Biogeosciences*) n'ont pas mesuré les paramètres fonctionnels microbiens et bien que la seconde étude mette en évidence un changement des relations plantes-microorganismes, elles ne permettent pas d'affiner notre compréhension de ces relations. Comme, les résultats tirés de ces études nécessitent la mise en place d'autres expérimentations, elles ne seront pas discutées.

2. Les relations plantes-microorganismes

a. Les mécanismes fins

L'étude de l'exsudation des composés carbonés par les racines des plantes menée par nos collègues barcelonais (Chapitre 3 - article annexe) a confirmé que la quantité totale de C exsudé était positivement corrélée avec la quantité de biomasse racinaire (Van der Krift *et al.*, 2001; Pausch *et al.*, 2013). Nous avons aussi montré que la quantité de C exsudé par g de racine était négativement corrélée avec la quantité de biomasse. Bien que les analyses n'aient pas pu mettre en évidence de relations significatives aux traits foliaires marqueurs des stratégies d'utilisation des ressources par les plantes, ce patron d'exsudation semble globalement refléter la stratégie des espèces puisque les espèces exploitatrices produisent beaucoup de racines peu denses (Craine *et al.*, 2001), et donc moins d'exsudats par gramme de racines. Les mécanismes expliquant cette exsudation sont difficiles à identifier, notamment il reste complexe de déterminer si ce flux de C est passif ou actif (Wright *et al.*, 1998;

Warembourg & Estelrich 2001; Bahn *et al.*, 2013). Cependant, cette étude soutient plutôt l'hypothèse d'un mécanisme actif lié à la morphologie des racines avec des espèces conservatrices caractérisées par un système racinaire moins long, plus fin et plus dense (faible SRL). Ces racines plus denses pourraient expliquer une plus forte rhizodéposition par g de racine (Kuzyakov et Xu, 2013). Enfin, un seul autre trait végétal, à savoir, le RNC a montré une corrélation (négative) avec la quantité de C exsudé. Cette corrélation suggère que la qualité des racines (concentrations relatives en N et C) puisse co-varier avec la quantité des exsudats racinaires (Valé *et al.*, 2005; De Deyn *et al.*, 2008; Orwin *et al.*, 2010), ou bien que le C exsudé, assimilé par les microbes, intensifie la compétition pour l'N du fait de la stimulation de l'activité des microorganismes (Kuzyakov & Xu, 2013). En effet, l'exsudation de composés carbonés engendre dans un premier temps une limitation en N des microorganismes qui vont en augmenter son absorption et ensuite avoir un effet d'amorce « primer effect » stimulant la minéralisation de l'N de la matière organique du sol, ce qui profitera aux plantes. Cette relation entre concentration en nutriments dans les racines et activités microbiennes a également été observée dans l'étude à l'échelle de l'individu (chapitre 3). Les résultats obtenus montrent des relations entre la dénitrification potentielle (DEA) et le RNC (négative) qui reflètent un lien avec la biomasse racinaire, notamment lorsque la disponibilité en nitrate du sol est faible. En effet, lorsque la quantité en nitrate est faible, l'espèce de notre étude avec le plus faible RNC augmente sa biomasse racinaire, ce qui suggère une forte exsudation de composés carbonés. Cette exsudation de C stimulerait ainsi la DEA puisque les communautés dénitrifiantes sont hétérotrophes (Falção Salles *et al.*, 2009). Cette augmentation de biomasse racinaire en réponse à une faible disponibilité en N dans le sol n'a pas été observée chez toutes les espèces de notre étude et nous a permis d'identifier deux types de stratégies. En effet, nous avons observé qu'en présence de microorganismes dans le sol (chapitre 3), les rapports C:N des feuilles et des racines augmentent chez toutes les espèces, ce qui suggère une augmentation de la photosynthèse couplée à une plus forte allocation de C dans les racines (Miller *et al.*, 2002 ; Phillips *et al.*, 2009; Bengtson *et al.*, 2012). Cette allocation de C se traduit soit par une augmentation de la biomasse racinaire chez l'espèce la plus exploitatrice (*D. glomerata*), soit par une augmentation de l'intensité de la mycorhization chez la plus conservatrice (*F. paniculata*). L'observation d'une opposition claire entre biomasse racinaire totale des plantes et intensité de la colonisation par les mycorhizes arbusculaires soutient cette hypothèse. Ainsi, les traits racinaires reflèteraient deux stratégies de prospection du sol. D'un côté les espèces exploitatrices qui privilégient une forte production de biomasse pour prospecter le sol (Craine, 2009). Cette production intense

de biomasse entraîne un taux d'exsudation de C important pour stimuler la minéralisation de l'N mais aussi la compétition avec les microorganismes à court terme (Kuzyakov & Xu, 2013).

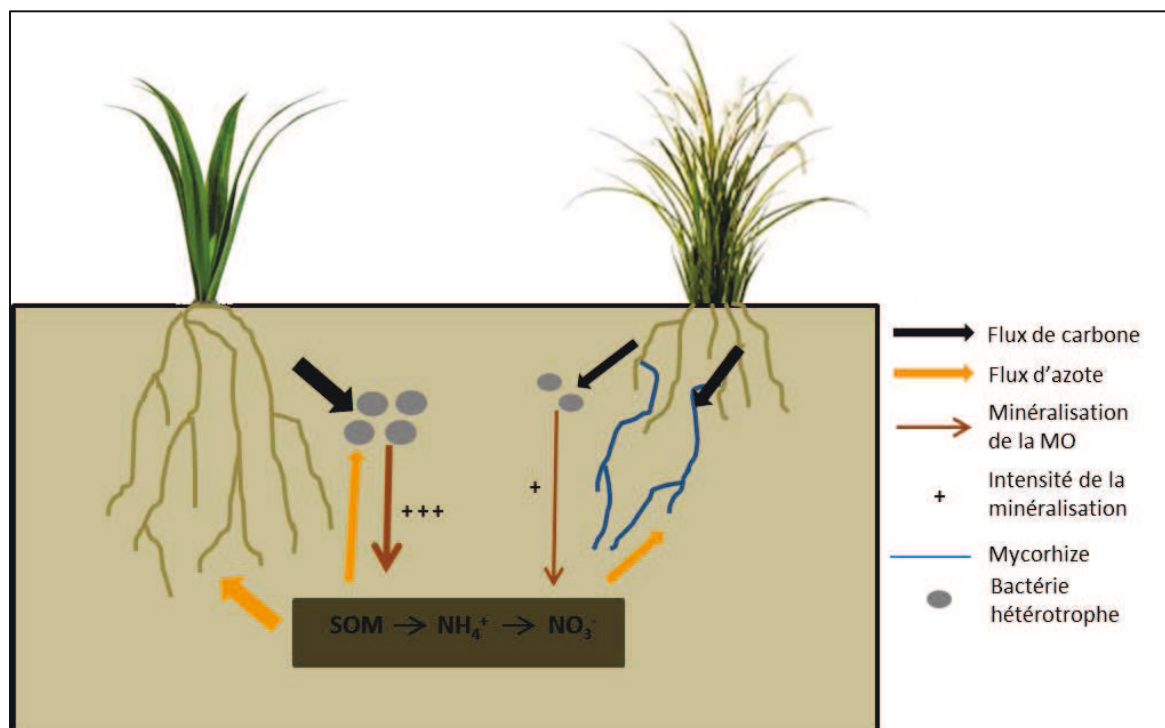


Figure 2 : Schéma synthétique des mécanismes fins des relations plante-microorganismes chez une espèce exploitatrice (à gauche) et une espèce conservatrice (à droite). L'espèce exploitatrice produit une forte biomasse racinaire pour prospecter le sol et exsude une quantité importante de C pour stimuler la minéralisation de l'N par les microorganismes hétérotrophes du sol. L'espèce conservatrice investit son C dans la symbiose mycorhizienne pour prospecter le sol et augmenter son acquisition en azote.

A l'opposé, les espèces conservatrices produisent moins de racines mais plus denses, ce qui favorise la colonisation par les mycorhizes arbusculaires (Brundrett, 1991 ; Urcelay *et al.*, 2009) pour prospecter le sol et augmenter leur acquisition d'N (Bonneau *et al.*, 2013) (Fig. 2).

Les deux études sur plantes individuelles nous ont donc permis d'identifier que **les traits (RNC) et la biomasse racinaires sont des marqueurs des relations plantes-microorganismes**. Ces traits reflètent les capacités d'exsudation des plantes ainsi que leur capacité à développer des symbioses avec les champignons mycorhiziens arbusculaires.

b. Les interactions plantes-microorganismes et les propriétés des écosystèmes

Les mécanismes fins d'interactions entre les plantes et les micro-organismes ont révélé l'importance des traits racinaires à partir d'observation sur des espèces avec des traits très contrastés. La mise en place de communautés artificielles recouvrant un gradient de traits continu et plus large a montré que ces traits racinaires permettaient également de prédire les propriétés écosystémiques (EP) à cette échelle. En effet, l'étude du chapitre 4 a, pour la première fois, quantifiée la contribution relative des effets des propriétés du sol, des traits fonctionnels végétaux, des paramètres fonctionnels microbiens, et de leurs interactions aux variations conjointes d'un ensemble de propriétés des écosystèmes associées au cycle de l'N (EP ci-après). Cet ensemble comprenait la production de biomasse végétale (aérienne et souterraine) ainsi que certaines caractéristiques du sol, à savoir, la biomasse microbienne totale, la teneur en matière organique, le potentiel de minéralisation de l'N ainsi que les capacités de lessivage de l'N inorganique. Cette étude n'avait pas pour objectif d'identifier les traits impliqués dans les mécanismes sous-jacents aux relations plantes-microbes, ce qui sera fait par un article collectif en cours de préparation par nos partenaires anglais du projet VITAL. Dans cette perspective, l'utilisation du terme 'modèle' se rapporte à l'utilisation de méthodes statistiques. Ces méthodes permettent de relier la variance observée sur l'ensemble des valeurs d'une variable dite de réponse (ici, une propriété de l'écosystème) à la variance observée sur une variable dite explicative (ici, les traits fonctionnels végétaux, les paramètres fonctionnels microbiens ou les propriétés du sol).

En intégrant les trois sites du projet VITAL, et donc les différentes interactions mises en évidence sur chacun d'entre eux, nos modèles ont montré que ce sont les effets conjoints du sol, des communautés végétales et microbiennes qui influencent le plus les EPs. Ceci confirme l'importance des interactions entre le sol et les communautés végétales pour le fonctionnement des écosystèmes (Wardle *et al.*, 2004; Van der Putten *et al.*, 2009; Bardgett & Wardle, 2010). Cependant, à l'échelle d'un site avec ses caractéristiques propres, les modèles révèlent que c'est la contribution indépendante d'une ou deux de ces jeux de variables explicatives qui contribuent le plus fortement aux variations des EPs, et que ces différences de contributions sont liées au patron de variation de la fertilité des sols entre les trois sites. En effet, les paramètres fonctionnels microbiens sont les variables explicatives majeures des EPs pour le site le moins fertile (Autriche), alors que ce sont les traits fonctionnels végétaux pour le site le plus fertile (UK). Dans le cas du site avec une fertilité intermédiaire (France), les EPs sont expliquées par une contribution conjointe des paramètres fonctionnels microbiens et des propriétés du sol. Ainsi, les écosystèmes plus fertiles avec un cycle des nutriments rapide

(notamment de l’N) seraient plutôt contrôlés par les communautés végétales et leurs cortèges de traits, alors que ceux caractérisés par une forte rétention des nutriments le seraient plutôt par les communautés microbiennes (Bardgett *et al.*, 2003; Robson *et al.*, 2010) (voir aussi Grigulis *et al.*, (2013) pour la confirmation de cette hypothèse au champ).

Bien que le détail des relations positives et négatives entre EPs diffèrent au sein des trois sites, les variables explicatives impliquées sont globalement les mêmes. Dans la majorité de nos modèles, les traits racinaires sont les traits fonctionnels végétaux les plus retenus. Par exemple, le diamètre des racines est le trait fonctionnel végétal le plus souvent relié à la biomasse végétale aérienne (ABM : Above-ground BioMass), et est en accord avec d’autres études détectant un effet de l’allocation de biomasse dans les racines ou de la profondeur des racines à la production aérienne (Mokany *et al.*, 2008 ; Schumacher & Roscher, 2009). Ce résultat suggère alors la pertinence de l’intégration des traits racinaires dans les analyses de la production aérienne, et pas seulement des traits foliaires comme cela est classiquement fait (Garnier *et al.*, 2004; Laliberté & Tylianakis, 2012). Le seul trait non racinaire retrouvé dans nos modèles est la hauteur végétative qui a souvent été identifiée comme indicateur de la production de biomasse aérienne (Ansquer *et al.*, 2009; Lienin & Kleyer, 2012; Butterfield & Suding 2013), et tout comme l’allocation de biomasse racinaire ou la profondeur d’enracinement pourrait être un indicateur global de taille des plantes. En accord avec des études précédentes (Bremer *et al.*, 2007; Bardgett *et al.*, 2007), nous avons également mis en évidence des relations entre la biomasse aérienne et des paramètres fonctionnels microbiens, dont l’identité variait en fonction des concentrations en nutriments du sol. En effet, l’ABM est apparue majoritairement corrélée négativement à un paramètre fonctionnel de la nitrification (l’abondance du gène des communautés *Nitrospira*) dans les sols non fertilisés, alors qu’elle était corrélée négativement à un paramètre fonctionnel de la dénitrification (DEA) dans les sols fertilisés.

Ces relations entre ABM, traits fonctionnels racinaires et ces paramètres fonctionnels microbiens impliqués dans le cycle de l’N semblent confirmer les hypothèses que nous avons émises avec les expérimentations contrôlées. En effet, ces résultats suggèrent que l’ABM résulte de la compétition pour les ressources azotées inorganiques, et donc des stratégies mises en place par les plantes, à travers leurs traits racinaires pour acquérir ces ressources. En plus de cet effet sur la production aérienne, les traits racinaires et les paramètres de dénitrification influençaient également les processus du sol, et bien qu’il soit difficile de dégager un patron simple et d’expliquer les mécanismes sous-jacents, les résultats obtenus sur

le site français reflètent bien l'importance de ces traits. En effet, le site français présente la particularité que l'ABM ne soit pas très variable entre mésocosmes dominés par des communautés végétales avec des traits contrastés (cf. chapitre 4), et dans deux des modèles propres à ce site, les paramètres fonctionnels microbiens de dénitrification (DEA et le gène *nirS*), et les traits fonctionnels racinaires, sont apparus fortement impliqués dans la variation des EPs associées au cycle de l'N dans le sol.

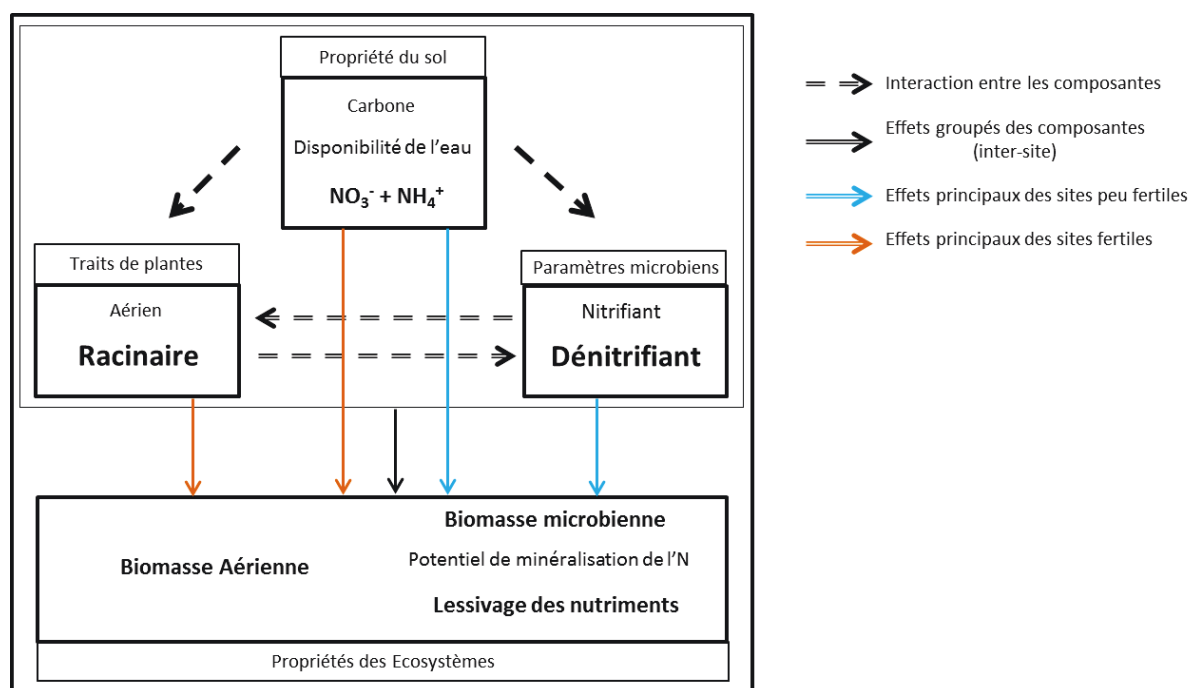


Figure 3. Principales variables impliquées et contributions relatives des propriétés du sol, des traits fonctionnels végétaux et des paramètres fonctionnels microbiens sur les propriétés des écosystèmes. Les variables en gras sont susceptibles d'être les facteurs principaux de chacune des composantes. Légende : azote (N).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les paramètres fonctionnels microbiens répondent à la disponibilité des nutriments du milieu mais aussi aux réponses des communautés végétales à cette disponibilité à travers de leurs traits fonctionnels (notamment racinaires). Associés avec les observations faites en conditions contrôlées, les résultats de ce chapitre confirment **l'importance des traits fonctionnels racinaires et des paramètres fonctionnels microbiens pour le fonctionnement de l'écosystème.** Ces traits sont donc de bons marqueurs des relations plantes-microbes et de leurs impacts sur le cycle des nutriments, notamment l'N, et sur les EPs qui en dépendent (Fig. 3).

c. Confirmation des patrons *in situ*

La réalisation de campagnes d'échantillonnage au champ est une étape nécessaire à la validation des patrons déterminés en conditions contrôlées. Elle nécessite une sélection pertinente de prairies (modèle de notre étude) permettant d'obtenir un gradient des variables d'intérêt. Dans notre cas, une gamme de types de gestion passée et actuelle des prairies a été sélectionnée car les pratiques agricoles induisent un changement de composition des communautés végétales, microbiennes et des propriétés du sol (Bardgett *et al.*, 2001 ; Tasser & Tappeiner, 2002 ; Quétier *et al.*, 2007). Nous avons ainsi pu avoir accès à un gradient de fertilité des sols et donc de traits fonctionnels végétaux et de paramètres microbiens suffisamment large pour tester les hypothèses émises quant à leurs interrelations en conditions contrôlées. A partir d'une méthode statistique excluant les effets sites dits aléatoires (non expliqués par nos variables) pour ne garder que les effets expliqués par les variables mesurées, nous avons : (i) déterminé si les traits fonctionnels racinaires sont plus étroitement liés aux paramètres fonctionnels microbiens que les traits foliaires ; (ii) évalué la contribution relative des traits fonctionnels aériens et des paramètres fonctionnels microbiens sur une gamme d'EPs.

Les mesures *in situ* (chapitre 4, Legay *et al.*, soumis) ont confirmé l'influence des traits fonctionnels végétaux sur les paramètres fonctionnels microbiens impliqués dans le cycle de l'N, bien que le sol soit le facteur majeur de la structure et du fonctionnement des communautés microbiennes (Henry *et al.*, 2008 ; Bannert *et al.*, 2011). En effet, le sol explique à lui seul 5 des 14 paramètres fonctionnels microbiens mesurés, et est le facteur majeur de la variation de 6 autres. Notre étude a confirmé les résultats de nombreuses études, à savoir que le pH (Fierer and Jackson, 2006), la disponibilité des nutriments (Verhamme *et al.*, 2011), et la quantité de C du sol (Fontaine & Barot, 2005) sont des propriétés édaphiques importantes qui gouvernent la distribution et le fonctionnement des communautés microbiennes. Bien que ces propriétés du sol impactent également les communautés végétales (Grime, 1977 ; Ordoñez *et al.*, 2009), l'inclusion des traits fonctionnels végétaux dans nos modèles a permis d'augmenter significativement la part de variance des paramètres fonctionnels microbiens expliquée. Après avoir vérifié que les traits racinaires et foliaires étaient indépendants les uns des autres, nous avons confirmé que les traits racinaires étaient beaucoup plus impliqués dans les variations des paramètres fonctionnels microbiens que les traits foliaires. La part de variance expliquée par ces traits végétaux est très faible pour les activités enzymatiques et la biomasse microbienne totale. Par contre de fortes relations ont été mises en évidence avec la proportion de champignons et de bactéries (rapport F : B) dans le

sol ainsi qu'avec les abondances de gènes des communautés nitrifiantes et dénitrifiantes. Le lien avec le rapport F : B confirme des résultats déjà rapportés dans la littérature (De Vries *et al.*, 2009) et est très intéressant dans le cadre de la compréhension du fonctionnement des écosystèmes. Les liens obtenus avec les gènes des communautés microbiennes du cycle de l'N s'explique par une co-variation de traits et des paramètres des plantes et des microorganismes en réponse à la disponibilité en nutriment du milieu. **Les relations étroites entre les communautés dénitrifiantes et les traits racinaires observées en conditions contrôlées ont été confirmées dans cette étude au champ le long d'un gradient de prairies.**

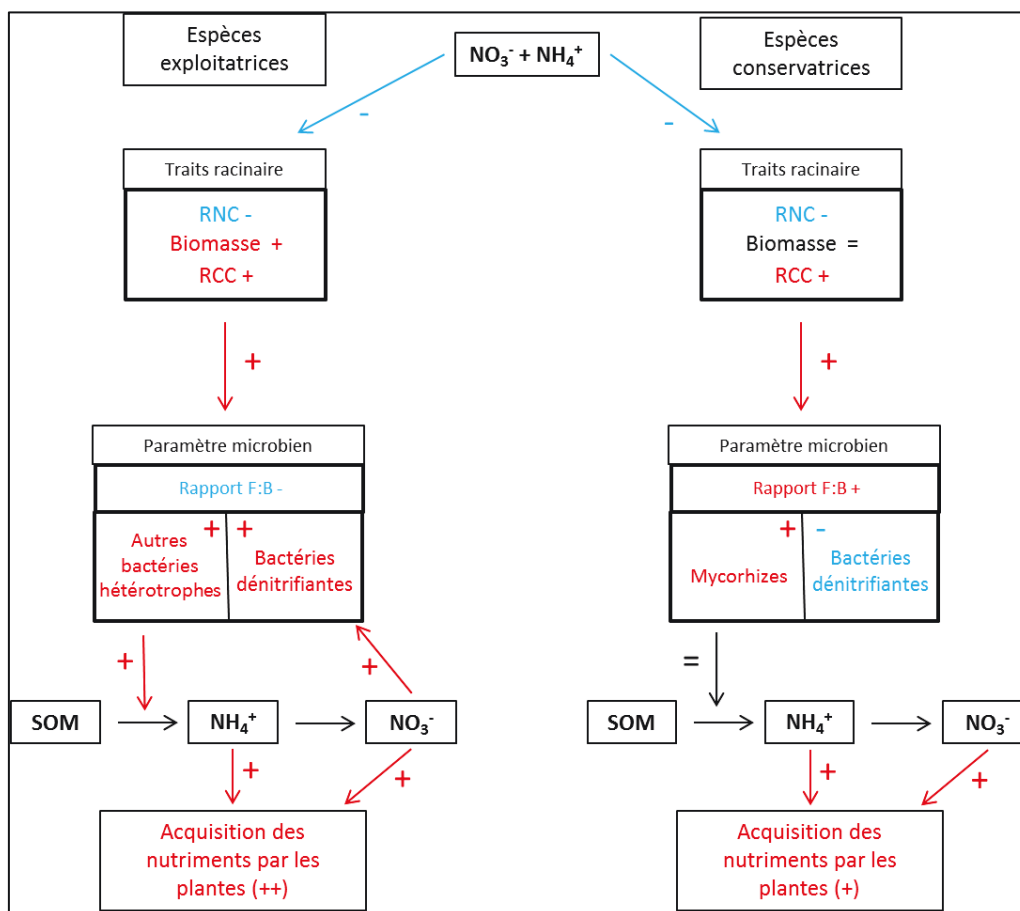


Figure 4 : Diagramme schématisant des réponses potentielles des communautés végétales à la disponibilité en nutriments. Effet de ces réponses sur les communautés microbiennes construit d'après les résultats des analyses en conditions contrôlées et *in situ* (Legay *et al.*, soumis à *Ecology*). Les variables et les flèches bleues représentent des paramètres dont les valeurs absolues diminuent (-) et des effets négatifs (-). Les variables et les flèches rouges représentent des paramètres dont les valeurs absolues augmentent (+) et des effets positifs (+). SOM : Matière organique du sol.

Ainsi dans les trois études où les paramètres de dénitrification ont été mesurés, un lien a toujours été démontré avec la concentration en C et en N des racines (ou le rapport C:N). Ce

résultat nous permet donc de confirmer les mécanismes mis en avant en conditions contrôlées pour les études *in situ*. A savoir **une réponse des plantes aux conditions du milieu (nutritives notamment) qui influence les communautés microbiennes à travers les effets de leurs traits fonctionnels racinaires** (Fig. 4).

Les effets des interactions entre traits fonctionnels végétaux et paramètres fonctionnels microbiens sur les EPs ont aussi été analysés indépendamment (Grigulis *et al.*, 2013) ont montré que les traits fonctionnels végétaux contribuaient plus au contrôle de la production de biomasse aérienne qu'aux processus du sol liés à la rétention des nutriments. Les EPs tels que la quantité de biomasse verte ou de litière étaient contrôlées à plus de 80% par les traits fonctionnels végétaux alors que les processus liés aux cycles des nutriments (ex: lessivage NO_3^-) du sol étaient régulés à plus de 70% par les paramètres fonctionnels microbiens. **Cependant, dans cette analyse (Grigulis *et al.*, 2013), les traits racinaires n'ont pas été inclus et, si l'on se base sur les résultats de toutes nos expériences précédentes, il est évident que les contributions relatives de chacune des composantes impliquées ici seraient très probablement modifiées par l'intégration des traits racinaires dans les modèles statistiques.** Ce changement de contribution serait potentiellement plus important pour les processus du sol. Les EPs aériennes sont reliées majoritairement (78%), et très logiquement, à des traits aériens (hauteur végétative, SLA...), et l'apport des traits racinaires n'aurait probablement pas augmenté de manière significative la prédictibilité de ces modèles. Par contre, les modèles statistiques des EPs du sol (lessivage, SOM...) qui impliquent majoritairement les microorganismes, et qui sont expliqués au maximum à 60% par Grigulis *et al.*, (2013), seraient vraisemblablement améliorés par l'intégration des traits racinaires. En effet, pour les mêmes EPs du sol, les traits foliaires impliqués dans ces modèles n'ont jamais été sélectionnés dans l'étude en mésocosme lorsque les traits racinaires étaient inclus. En effet, dans cette expérimentation en mésocosme (chapitre 4), une implication importante des traits racinaires seuls ou en interactions avec le sol et les microorganismes sur les EPs du sol a été démontrée. Une telle analyse intégrant les traits fonctionnels végétaux aériens et souterrains et les paramètres fonctionnels microbiens à l'analyse des variations des EPs reste à réaliser.

Collectivement les résultats de toutes ces études à des échelles différentes (pots, mésocosmes et *in situ*) nous permettent d'affirmer que les traits fonctionnels végétaux et notamment les traits racinaires structuraux et chimiques montrent des liens étroits avec

les paramètres fonctionnels microbiens. Ces traits végétaux influencent, notamment de par leurs liens avec les microorganismes impliqués dans la transformation de l’N, l’intensité du cycle des nutriments. Bien que les mécanismes sous-jacents à ces relations soient encore peu clairs, les liens retrouvés tout au long de nos expériences entre les paramètres fonctionnels microbiens de la dénitrification et les traits fonctionnels végétaux, nous permettent de suggérer que certains de ces liens seraient pilotés par les plantes. En effet, **les relations observées de manière répétée entre le RNC, le RDMC ou la biomasse racinaire, et les communautés dénitrifiantes suggèrent qu’à travers la vitesse d’acquisition des nutriments azotés et l’exsudation de C, les plantes influencent ces communautés.** L’interaction qui en découle impacte donc la vitesse de recyclage de l’N dans le milieu et ainsi les EP associées (Fig. 5).

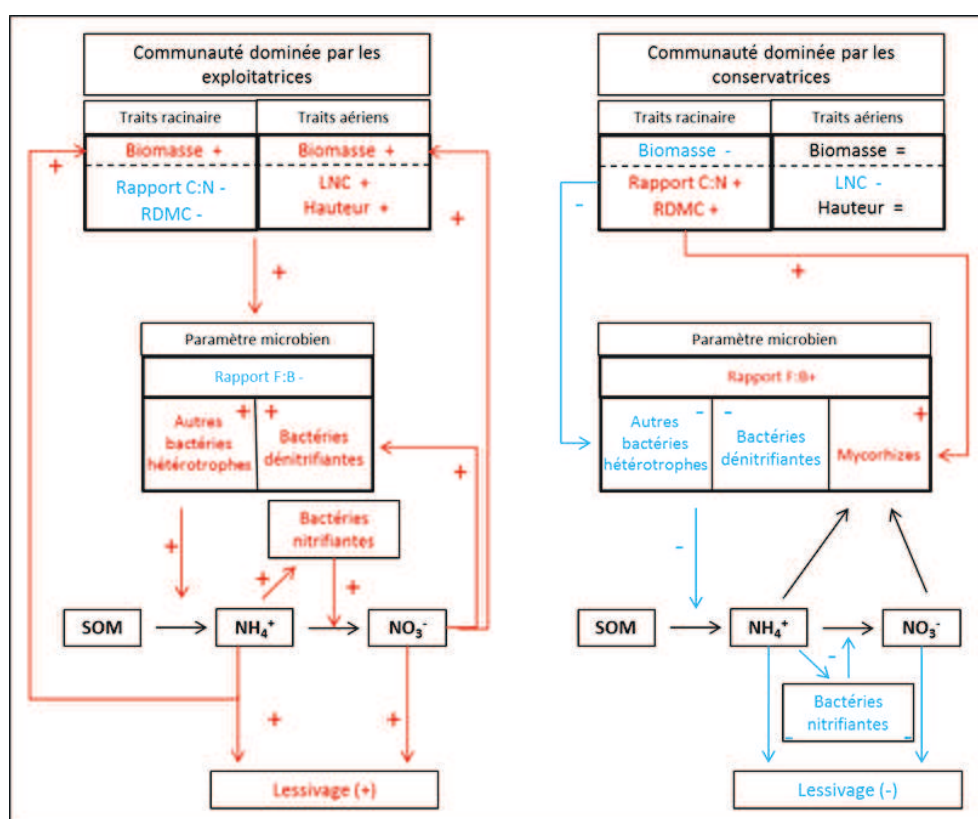


Figure 5: Diagramme schématisant les effets de communautés végétales à stratégies d’acquisition des nutriments différentes sur les communautés microbiennes et certaines propriétés écosystémiques. Apport de l’étude *in situ* sur la contribution des traits fonctionnels végétaux et des paramètres fonctionnels microbiens sur une gamme de propriétés des écosystèmes (Grigulis et al., 2013). Les variables et les flèches bleues représentent des paramètres dont les valeurs absolues diminuent (-) et des effets négatifs (-). Les variables et les flèches rouges représentent des paramètres dont les valeurs absolues augmentent (+) et des effets positifs (+). SOM : Matière organique du sol.

d. Stratégies d'acquisition des nutriments et relations avec les communautés microbiennes.

Les préférences d'absorption des formes d'N inorganique par les plantes subalpines mesurées par traçage isotopique sur racines excisées (chapitre 6), couplées aux résultats sur plantes entières en conditions contrôlées (chapitre 3), suggèrent que les patrons d'absorption de l'N par les plantes pourraient expliquer les relations fines observées entre communautés végétales et communautés dénitrifiantes. Les communautés dominées par des espèces exploitatrices sont caractérisées par un RNC élevé (Craine *et al.*, 2002), et absorbent plus de NO_3^- et de NH_4^+ comparativement aux communautés dominées par des espèces conservatrices, et ont une utilisation préférentielle du NO_3^- (Grassein *et al.*, soumis). A l'opposé, les espèces conservatrices caractérisées plutôt par un RNC faible (Roumet *et al.*, 2006b), absorbent faiblement les deux formes d'N avec une préférence pour le NH_4^+ . Cette observation explique partiellement la relation entre le RNC et la DEA, et la compétition pour l'N du sol entre végétaux et microorganismes.

En effet, les espèces à RNC élevé absorbent relativement plus de NO_3^- que les espèces à faible RNC, et sont donc en plus forte compétition (pour les NO_3^-) avec les communautés dénitrifiantes. L'étude sur la rhizodéposition présentée en annexe du chapitre 2 (Baptist *et al.*, in prep) a démontré que les espèces produisant le plus de biomasse racinaire exsudaient plus de C (Van der Krift *et al.*, 2001; Pausch *et al.*, 2013). Ce patron dépend de la concentration en N des racines ce qui sous-tend deux mécanismes potentiels:

- D'une part, les espèces à RNC élevé (exploitatrices) exsudent moins de C comparativement aux espèces à faible RNC (conservatrices) et limitent le développement et l'activité des communautés microbiennes dénitrifiantes avec qui elles sont en compétition pour le NO_3^- .

- D'autre part, les espèces avec une forte production de biomasse (exploitatrices), fabriquent lors de leurs phases de prospection du sol des racines pauvres en N (effet dilution) qui exsudent une forte quantité de C pour stimuler l'activité microbienne et la minéralisation de l'N (Kuzyakov & Xu, 2013).

Je pense que la seconde hypothèse est celle qui correspond le mieux aux différents résultats obtenus. **En effet, lors de l'établissement et du développement des espèces exploitatrices (chapitre 3), celles-ci produisent une quantité de biomasse racinaire importante pour prospecter le sol. Lors de la prospection de nouvelles zones du sol, ces racines nouvellement produites avec un RNC faible vont exsuder une forte quantité de composés carbonés utiles aux communautés microbiennes hétérotrophes et notamment aux**

bactéries dénitrifiantes. La stimulation de ces communautés bactériennes peut engendrer un effet d'amorce (priming effect – Kuzyakov, 2006) sur la dégradation et la minéralisation de la matière organique du sol, et donc augmenter la disponibilité de l'N pour la croissance des plantes. Cette hypothèse est soutenue par les résultats obtenus en mésocosmes (chapitre 4) montrant le rôle des racines dans les processus du sol et dans la production de biomasse aérienne. Les observations faites au champ (chapitre 5) soutiennent également cette hypothèse puisque nous avons montré que les communautés dominées par les espèces exploitatrices étaient probablement liées à des communautés microbiennes dominées par les bactéries. Ces deux facteurs associés favorisent une circulation rapide et une production forte de d'N inorganique nécessaire à une forte production de biomasse mais aux risques d'une perte importante de nutriments azotés par lessivage (Fig. 6). Pour finir, l'effet d'amorce des plantes sur la dégradation de la matière organique par les microbes expliquerait le contrôle partagé sur la séquestration du C démontré en conditions *in situ* (chapitre 5).

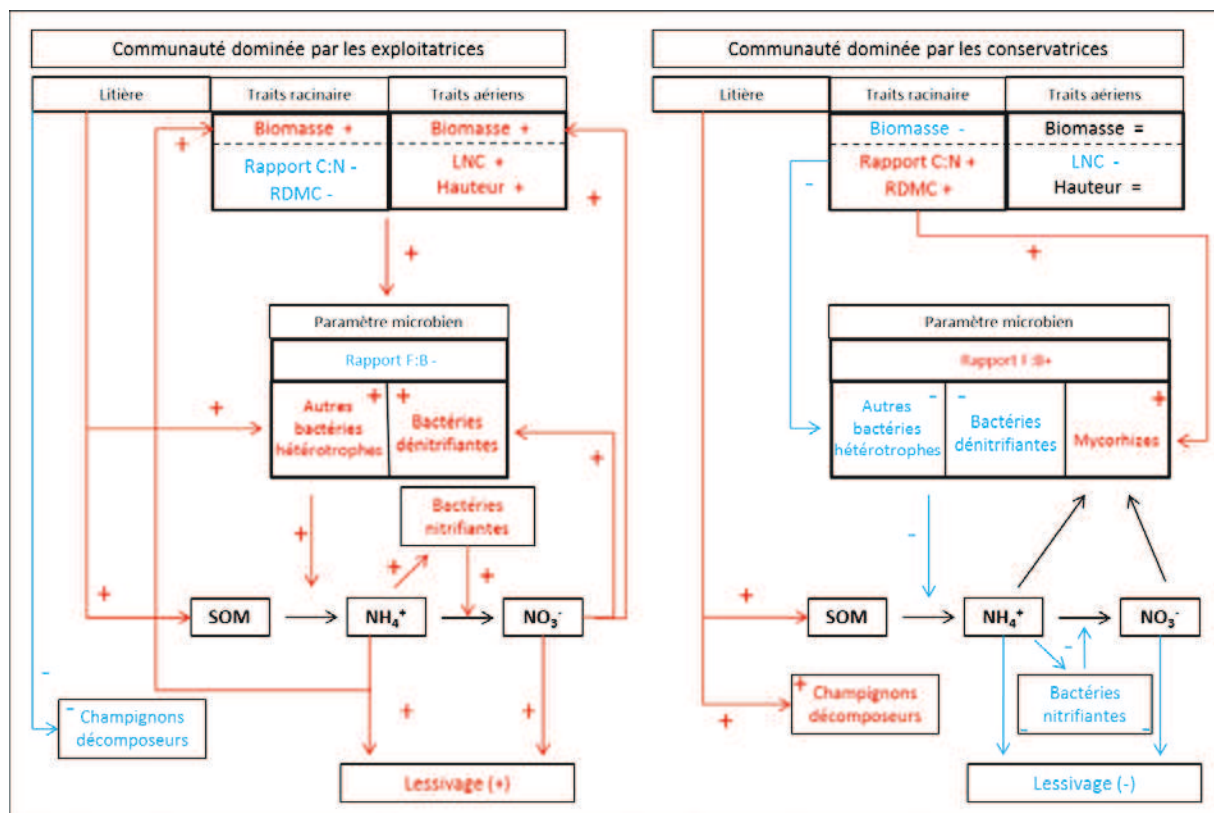


Figure 6 : Diagramme schématique comparant les effets de communautés végétales à stratégies d'acquisition des nutriments différentes sur les communautés microbiennes et leurs impacts sur le cycle de l'N. Les variables et les flèches bleues représentent des paramètres dont les valeurs absolues diminuent (-) et des effets négatifs (-). Les variables et les flèches rouges représentent des paramètres dont les valeurs absolues augmentent (+) et des effets positifs (+). SOM : Matière organique du sol.

En suivant la même logique, il est également possible d'émettre une hypothèse sur le fonctionnement des écosystèmes dominés par les communautés conservatrices. Celles-ci sont plutôt caractérisées par une production lente de biomasse et un RNC faible. A la différence des espèces exploitatrices, les résultats en conditions contrôlées (en pots - chapitre 3) suggèrent que **du fait d'un développement faible de leurs systèmes racinaires, les espèces conservatrices favorisent plutôt la colonisation par les mycorhizes arbusculaires. Ainsi, le C alloué aux racines n'est pas exsudé majoritairement dans le sol mais utilisé par ces champignons symbiotiques.** Ce raisonnement est cohérent avec la bibliographie qui montre que les racines des espèces conservatrices sont caractérisées par des tissus denses (RDMC élevé) qui favorisent la colonisation mycorhizienne (Urcelay *et al.*, 2009). **Cette faible exsudation de composés carbonés dans le sol couplée à une faible qualité de la litière des espèces conservatrices, favorise les communautés de microorganismes décomposeurs et donc majoritairement les communautés fongiques.** Cette hypothèse est confirmée en conditions *in situ* où les prairies dominées par les espèces conservatrices possèdent des communautés microbiennes dominées par les champignons (Grigulis *et al.*, 2013). L'association de ces deux facteurs, faible exsudation de C et litières de mauvaises qualités, engendre un ralentissement du cycle des nutriments azotés et favorise leur rétention dans l'écosystème (Fig. 6).

3. Pertinence de l'utilisation des traits fonctionnels végétaux

L'ensemble de mes travaux de recherche ont confirmé l'utilité et la pertinence des traits fonctionnels végétaux comme marqueurs du fonctionnement des écosystèmes. Dans chacune de mes expérimentations, les mêmes traits permettent de différencier les mêmes espèces et leurs stratégies respectives d'acquisition et d'utilisation des ressources azotées (Lavorel & Garnier, 2002). Cet aspect n'est pas nouveau dans la littérature, mais il est important de le souligner puisque mes résultats ont montré que c'est à travers ces stratégies que les communautés végétales vont répondre aux conditions abiotiques du sol et influencer en retour les communautés microbiennes. Les réponses des plantes aux conditions abiotiques sont également reconnues dans la littérature puisqu'il a été montré que les traits fonctionnels végétaux pouvaient refléter la disponibilité en eau ou en nutriment du milieu (Hawkins *et al.*, 2003).

La contribution majeure de mes recherches concerne les nombreux liens que j'ai démontré entre ces traits végétaux et les communautés microbiennes, et principalement celles impliquées dans le cycle de l'N. Ces liens ne se sont pas limités à des descriptions de co-variations entre ces deux composantes de l'écosystème. En étudiant les mécanismes fins tel que l'exsudation de composés carbonés dans le sol, j'ai aussi suggéré une cascade d'effets et de réponses qui induisent des changements dans le fonctionnement des écosystèmes. A travers ces mécanismes, j'ai souligné la pertinence des traits fonctionnels végétaux pour prédire la structure et l'activité des communautés microbiennes du sol ainsi que la variation des fonctions des écosystèmes. Enfin, j'ai démontré à plusieurs reprises que les traits fonctionnels racinaires augmentaient significativement le pouvoir prédictif des traits fonctionnels végétaux alors même que la plupart des études se contentent que des traits aériens.

a. Apport des traits fonctionnels racinaires

A travers les différentes études réalisées, j'ai montré que les traits fonctionnels racinaires, souvent négligés dans les analyses écologiques parce que demandant un trop fort investissement de mesure, étaient fortement impliqués dans tous les processus écosystémiques étudiés dans mes travaux de recherches. Même si logiquement, les traits fonctionnels aériens ont une influence sur les communautés microbiennes du sol via les effets de la litière aérienne (De Deyn *et al.*, 2008), les traits fonctionnels racinaires ont des effets plus importants sur la structuration des communautés microbiennes du cycle de l'N. De plus, alors que de nombreuses études considèrent que les traits aériens déterminent de façon prépondérante la production de biomasse (Garnier *et al.*, 2004), nous avons montré que l'incorporation des traits racinaires augmentaient la qualité des modèles statistiques pour cette variable. Les analyses en mésocosmes ont révélé que les traits racinaires sont aussi impliqués dans les variations des processus écosystémiques du sol associés au cycle de l'N (voir aussi Klumpp & Soussana (2009) concernant les processus du cycle du C). L'influence sur ces processus s'explique par une action directe (absorption de l'eau et de nutriment) et indirecte (exsudation de C) des racines sur les communautés microbiennes. Ainsi, l'ensemble de ces résultats me permettent de proposer l'utilisation de certaines caractéristiques des racines comme marqueurs fonctionnels des relations plantes-microorganismes et des propriétés écosystémiques.

Exsudation de C / Lien avec les communautés bactériennes hétérotrophes:

- Biomasse racinaire (pas un trait *stricto sensu*)
- Concentrations en N et en C dans les racines

=> Influence sur la dégradation de la matière organique du sol (effet amorce)

=> Influence sur la biomasse microbienne du sol

=> Influence sur la vitesse de recyclage des nutriments azotés

Mycorhizotrophie :

- Biomasse racinaire (pas un trait *stricto sensu*)
- Concentration en C des racines
- Teneur en matière sèche / Diamètre

=> Influence sur la biomasse microbienne du sol

=> Influence sur la vitesse de recyclage des nutriments azotés

=> Influence sur le lessivage / rétention des nutriments (carbone et azote)

Acquisition des nutriments / Lien avec les communautés nitrifiantes et dénitrifiantes:

- Longueur spécifique racinaire
- Concentration en N des racines

=> Influence sur la biomasse microbienne du sol

=> Influence sur la vitesse du cycle des nutriments (azote)

=> Influence sur le lessivage / rétention des nutriments (carbone et azote)

Ces propositions se basent sur des études effectuées sur un type d'écosystème, les prairies de montagne et nécessiteront d'être confirmées sur d'autres écosystèmes prairiaux.

L'ensemble de mes travaux de thèse ont par ailleurs montré une contradiction avec la théorie d'un spectre d'économie à l'échelle de la plante entière (Roumet *et al.*, 2006b ; Freschet *et al.*, 2010). En effet, lors de mes études au champ (chapitre 5 - Legay *et al.*, soumis), j'ai montré que les traits fonctionnels végétaux aériens et racinaires étaient relativement indépendants l'un de l'autre, et que les concentrations en N des feuilles et des racines pouvaient avoir des effets différents sur les communautés microbiennes (Craine *et al.*, 2005 ; Tjoelker *et al.*, 2005). J'ai également démontré que ces deux types de traits végétaux pouvaient avoir un effet complémentaire et permettaient d'améliorer les prédictions de certains modèles comme celui de la production de biomasse. **Par conséquent, ces deux observations soulignent à la fois la**

complémentarité et la dichotomie des effets des traits fonctionnels racinaires et aériens sur le fonctionnement de l'écosystème.

b. Limites des traits fonctionnels racinaires

La mise en évidence de ces résultats sur les traits racinaires récompense des heures et des heures d'échantillonnage, de nettoyage, et de mesures à l'aide d'un scanner. Le fait que ces mesures soient extrêmement chronophages est probablement la raison majeure de l'exclusion de ce type de données de nombreuses études. Cette contrainte va probablement limiter le nombre d'études pourtant nécessaires à la confirmation de mes résultats dans les écosystèmes prairiaux mais aussi dans des écosystèmes où l'échantillonnage des systèmes racinaires est encore plus pénible comme les écosystèmes forestiers. Une fois cette contrainte courageusement surmontée, la comparaison des jeux de données, des résultats et donc des conclusions avec mes observations risque cependant d'être limitée en l'absence d'un protocole standard de mesures des traits racinaires comme celui existant pour les traits fonctionnels aériens (Cornelissen *et al.*, 2003).

Un protocole standard admis par la communauté scientifique éviterait de nombreux biais entre les jeux de données. Bien que certains protocoles existent tel que celui de Robertson *et al.* (1999), ils n'abordent pas tous les aspects des échantillonnages des racines qui nécessitent d'une part de fixer des conditions de mesures optimum et d'autre part de définir quelles parties du système racinaire doivent être échantillonnées. En effet, les mesures de traits sont souvent effectuées sur les dix premiers cm de racines, or les espèces ont des systèmes racinaires pouvant aller de quelques centimètres à plusieurs mètres de profondeur (Fig. 7).

De même une fois une profondeur définie, il se pose le problème de la façon de nettoyer les racines puisque c'est un moment critique où la perte des racines très fines peut être assez importante. L'utilisation de tamis superposés limite la perte mais augmente considérablement le temps de séparation des racines et du sol.



Figure 7 : Aperçu du système racinaire de *F. paniculata* pouvant atteindre deux mètres de profondeur.

Un compromis entre temps d'échantillonnage et qualité de la mesure doit être fait. Une fois le nettoyage terminé, le conditionnement est aussi un facteur de variation puisqu'en fonction de la solution utilisée, des biais de mesure de la longueur, du diamètre et de la concentration en nutriments sont probables. Enfin, il serait tout aussi utile de déterminer si les traits racinaires doivent être mesurés sur des racines épaisses ($>2\text{mm}$), fines ($<2\text{mm}$), ou sur les deux, sur les racines principales, secondaires, tertiaires, etc... Cette non prise en compte de l'ensemble du système racinaire est probablement une des raisons qui explique que dans nos études, les traits relatifs à la concentration des nutriments (RNC, RCC et rapport C : N) et à la teneur en matière sèche (RDMC) aient été plus souvent retenus comparativement aux traits relatifs à la longueur du système racinaire (SRL).

Une autre limite importante à la mesure des traits racinaires réside dans le fait que les mesures au champ ou dans des communautés artificielles se font sur des racines provenant de quelques carottes de sol prises au hasard dans la parcelle ou le mésocosme. Ainsi, contrairement aux traits aériens, dont les mesures se font sur chaque espèce et sont moyennées en fonction de leur abondance respective, la mesure dépend fortement des espèces contribuant à la masse racinaire de la carotte prélevée, et ainsi à la structuration spatiale des communautés. Par ailleurs le fait de ne pas connaître les structures d'abondances racinaires des communautés rend impossible l'utilisation de moyennes pondérées calculées à partir de base de données qui incorporent les traits racinaires. Cette différence avec la mesure des traits

aériens est cruciale si l'on considère que les espèces les plus abondantes d'un écosystème sont celles qui contribuent le plus à son fonctionnement (Grime *et al.*, 1998). Une méthode par spectroscopie proche infra-rouge (NIRS) a été mise au point pour déterminer la contribution de chaque espèce dans la biomasse racinaire totale (Roumet *et al.*, 2006a). Cependant elle présente pour le moment l'inconvénient de ne pas être facilement applicable *in situ* puisqu'elle nécessite la préparation d'échantillons de références, à partir de racines de chacune des espèces présentes dans la communauté, entraînant donc un investissement de temps considérable.

Par conséquent, les résultats obtenus avec les traits fonctionnels racinaires sont prometteurs du fait qu'ils améliorent notre compréhension du fonctionnement des écosystèmes, mais ils nécessitent d'être confirmés. Pour cela, la mise au point d'un protocole standard de mesures au champ et au laboratoire utilisable et utilisé par la communauté scientifique est indispensable.

4. Limites de l'étude

Bien que j'ai soulevé les limites des traits fonctionnels racinaires, notamment en termes de méthodologie, je ne considère pas que ce point soit une limite fondamentale de mon étude. En effet, les patrons de traits racinaires des espèces avec des stratégies d'acquisition des nutriments observés dans mes études sont similaires à ceux rapportés dans la bibliographie, et me permettent de penser que ma méthodologie n'a pas entraîné de biais majeurs sur mes résultats. De plus, les mêmes protocoles de récolte et de mesures ont été appliqués pour toutes les expérimentations et sur tous les sites, validant l'aspect comparatif entre nos trois sites d'études et de nos différentes expérimentations.

Pour appréhender le fonctionnement des écosystèmes, mes travaux de recherches se sont basés sur de nombreux paramètres physico-chimiques, sur les communautés végétales et sur les communautés microbiennes impliquées dans le cycle de l'N. Cette fixation des relations plantes-microorganismes autour du cycle de l'N est probablement la limite majeure de mon étude. En effet, bien que l'N est sans conteste l'un des éléments essentiel à la croissance des plantes et des microorganismes du sol (Kaye & Hart, 1997), l'autre élément majeur qu'est le phosphore n'a pas été étudié. Or c'est aussi un des nutriments les plus limitant dans tous les écosystèmes (Elser *et al.*, 2007) et qui est reconnu comme ayant une importance majeure dans les relations plante-microorganisme (Jonasson *et al.*, 1996 ; Rooney & Clipson, 2009).

L'étude des microorganismes du sol impliqués dans son cycle et des traits fonctionnels végétaux associés à son acquisition/utilisation aurait certainement été un plus dans mon approche consistant à faire le lien entre les relations plantes-microorganismes et les propriétés des écosystèmes.

Enfin, pour une étude sur le fonctionnement des écosystèmes, dans le cadre des relations plantes-microorganismes, la non prise en compte de l'herbivorie domestique dans les études *in situ* peut également constituer une limite dans la compréhension des mécanismes impliqués. En effet, de nombreuses études ont montré que l'herbivorie modifiait les relations plantes-microorganismes, notamment par un effet de tassement du sol, qui a un impact sur sa disponibilité en eau (Drewry, 2006). Le pâturage entraîne un retour au sol partiel des nutriments *via* les fèces et les urines favorable à la productivité primaire (Bardgett & Wardle, 2003) et bien que le retour de la litière au sol soit réduit, elle est riche en N (Aerts *et al.*, 1999), et va stimuler la minéralisation de l'N et les communautés bactériennes (Wardle *et al.*, 2004). Le pâturage induit une augmentation au moins à court terme de l'exsudation racinaire et, par conséquent, permet une augmentation de la biomasse microbienne (Paterson & Sim, 1999 ; Murray *et al.*, 2004; Hamilton & Franck, 2001). Cette exsudation va favoriser la minéralisation de l'N organique du sol (Kuzyakov *et al.*, 2006) ainsi que la disponibilité en nutriment pour les plantes et par conséquence, leur productivité (Bardgett & Wardle, 2003). Même si l'intégration de niveaux trophiques supplémentaires aurait largement compliqué nos modèles, elles auraient probablement permis d'affiner la compréhension de nos modèles sur les relations plantes-microorganismes et sur le fonctionnement des écosystèmes.

5. Conclusions

a. Synthèse

L'ensemble des résultats obtenus au cours de mes travaux de recherche contribuent à améliorer la compréhension du fonctionnement et des propriétés des écosystèmes. A travers des études allant de l'identification des mécanismes fins impliqués dans les relations entre les communautés végétales et les communautés microbiennes jusqu'à la prise en compte des effets des variables abiotiques *in situ*, j'ai mis en évidence **des liens étroits entre ces composantes biotiques de l'écosystème qui influencent le fonctionnement de l'écosystème**. Bien que l'ensemble des propriétés de l'écosystème que nous avons quantifiées dépend aussi des conditions abiotiques, et notamment des propriétés du sol, nous avons montré que **les traits fonctionnels végétaux et les paramètres fonctionnels microbiens contribuent significativement, voire majoritairement en fonction des sites, à la variation de ces propriétés**.

En se concentrant sur les relations plantes-microorganismes dans le cadre du cycle de l'N, nous avons montré que les traits fonctionnels végétaux, reflétant les réponses des espèces aux propriétés du sol (disponibilité de l'N), avaient un impact sur la structure et l'activité des communautés microbiennes. **Ces stratégies d'acquisition et d'utilisation des nutriments mises en place par les espèces vont, par leurs effets sur les paramètres fonctionnels microbiens impliqués dans le cycle de l'N, soit accélérer le cycle des nutriments azotés et soutenir une forte production de biomasse, soit entrainer un ralentissement de ce cycle en favorisant la séquestration des nutriments**. Ces observations ont permis d'identifier des marqueurs fonctionnels des relations plantes-microorganismes : les traits racinaires qui sont trop souvent omis des analyses et des différents modèles prédictifs du fonctionnement des écosystèmes. Nous avons notamment **souligné l'importance des traits chimiques racinaires et d'un trait structurel (RDMC) dans les relations avec les microorganismes du sol**. Ces traits pourraient être impliqués dans les patrons de mycorhizotrophie des espèces végétales ou d'exsudation de C que nous suspectons d'être les mécanismes principaux à l'origine de l'influence des communautés végétales sur les communautés microbiennes et les propriétés écosystémiques.

D'un point de vue plus local, mes études ont fourni des pistes intéressantes pour comprendre le fonctionnement des prairies subalpines. L'apport des traits fonctionnels racinaires

permettraient d'une part d'améliorer la précision des modèles se basant seulement sur les traits aériens pour prédire les propriétés écosystémiques et des services qui en découlent. Ces traits racinaires apportent aussi un plus dans la compréhension des multiples stratégies qui semblent être mises en place par *Festuca paniculata*, cette espèce à la biologie très particulière qui domine les prairies de pente sur le site du Lautaret. Le traçage isotopique des formes inorganiques de l'N que j'ai réalisé au champ (chapitre 6 - Legay *et al.*, soumis), et dont les résultats n'ont pas été discutés puisqu'ils n'intégraient pas les traits fonctionnels végétaux et les paramètres fonctionnels microbien, a mis en évidence l'existence d'un changement de la dynamique de l'N inorganique à partir de mesures réalisées au début de la saison de végétation et comparées à de précédentes faites au pic de biomasse. J'ai montré que les plantes surpassent les capacités d'absorption de l'N inorganique des microorganismes en début de saison alors que le phénomène inverse se produit au pic de biomasse. Ce résultat suggère un changement dans les relations entre ces deux composantes et donc que des variations de dynamique de l'N existent tout au long de la période de végétation et influencent certainement les propriétés des écosystèmes. La prise en compte et une meilleure connaissance de ces dynamiques, par exemple en réalisant plusieurs campagnes d'échantillonnages au cours d'une saison, nous permettraient certainement d'apporter un aspect dynamique en intégrant une probable variabilité temporelle à nos modèles quantitatifs des propriétés écosystémiques.

b. Perspectives

Nos conclusions traduisent le résultat d'analyses basées sur un gradient de prairies de montagnes en Europe et possèdent donc, à priori, une validité supérieure à celles d'une étude de cas local limité par un historique et un ensemble de conditions biotiques et abiotiques particulières. Cependant, pour confirmer les patrons identifiés en termes de contributions des communautés végétales et microbiennes au fonctionnement des écosystèmes, et pour valider les traits racinaires comme prédicteurs des relations plantes-microorganismes, des études sur d'autres milieux et dans d'autres conditions "socio-climatiques" restent nécessaires. Dans un premier temps il serait utile de mener de telles études sur d'autres écosystèmes prairiaux, puis sur des milieux plus éloignées comme les tourbières et les forêts où les contraintes abiotiques majeures sont parfois totalement différentes de celles des prairies de montagne. On peut donc s'attendre à ce que les communautés végétales et microbiennes y étant dominées par des organismes avec des cortèges de traits contrastés, des mécanismes communs mais aussi

d'autres mécanismes que ceux défendus dans cette thèse seraient impliqués. Mais, dans tous les cas, la mise en place d'un protocole standardisé de mesure des traits racinaires suivi d'une analyse approfondie de leurs variations dans de nombreux milieux sont nécessaires afin de définir une gamme de traits pertinents associés à des processus écosystémiques.

L'application de la démarche mise en place dans ma thèse sur d'autres cycles biogéochimiques d'intérêt tels que ceux du carbone et du phosphore sont à envisager pour améliorer notre compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes. De plus, l'utilisation de méthode isotopique déjà au point et couramment utilisée en conditions contrôlées serait nécessaire pour intégrer l'aspect dynamique des flux de matières et affinerait notre compréhension des mécanismes impliqués dans les relations plantes-microorganismes.

Références citées

- Aerts, R. 1999. Interspecific competition in natural plant communities: mechanisms, trade-offs and plant-soil feedbacks. *Journal Of Experimental Botany* **50**:29-37.
- Ansquer, P., M. Duru, J. P. Theau, and P. Cruz. 2009. Functional traits as indicators of fodder provision over a short time scale in species-rich grasslands. *Annals Of Botany* **103**:117-126.
- Bahn, M., F. A. Lattanzi, R. Hasibeder, B. Wild, M. Koranda, V. Danese, N. Bruggemann, M. Schmitt, R. Siegwolf, and A. Richter. 2013. Responses of belowground carbon allocation dynamics to extended shading in mountain grassland. *New Phytologist* **198**:116-126.
- Bannert, A., K. Kleineidam, L. Wissing, C. Mueller-Niggemann, V. Vogelsang, G. Welzl, Z. H. Cao, and M. Schlöter. 2011. Changes in Diversity and Functional Gene Abundances of Microbial Communities Involved in Nitrogen Fixation, Nitrification, and Denitrification in a Tidal Wetland versus Paddy Soils Cultivated for Different Time Periods. *Applied And Environmental Microbiology* **77**:6109-6116.
- Bardgett, R. D., A. C. Jones, D. L. Jones, S. J. Kemmitt, R. Cook, and P. J. Hobbs. 2001. Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* **33**:1653-1664.
- Bardgett, R. D., R. van der Wal, I. S. Jonsdottir, H. Quirk, and S. Dutton. 2007. Temporal variability in plant and soil nitrogen pools in a high-Arctic ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* **39**:2129-2137.
- Bardgett, R. D. and D. A. Wardle. 2003. Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. *Ecology* **84**:2258-2268.
- Bengtson, P., J. Barker, and S. J. Grayston. 2012. Evidence of a strong coupling between root exudation, C and N availability, and stimulated SOM decomposition caused by rhizosphere priming effects. *Ecology and Evolution* **2**:1843-1852.
- Bonneau, L., S. Huguet, D. Wipf, N. Pauly, and H.-N. Truong. 2013. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*:n/a-n/a.
- Bremer, C., G. Braker, D. Matthies, A. Reuter, C. Engels, and R. Conrad. 2007. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of nirK-Type denitrifier communities in soil. *Applied And Environmental Microbiology* **73**:6876-6884.
- Brundrett, M. 1991. MYCORRHIZAS IN NATURAL ECOSYSTEMS. *Advances in Ecological Research* **21**:171-313.
- Butterfield, B. J. and K. N. Suding. 2013. Single-trait functional indices outperform multi-trait indices in linking environmental gradients and ecosystem services in a complex landscape. *Journal Of Ecology* **101**:9-17.
- Cleveland, C. C., A. R. Townsend, D. S. Schimel, H. Fisher, R. W. Howarth, L. O. Hedin, S. S. Perakis, E. F. Latty, J. C. Von Fischer, A. Elseroad, and M. F. Wasson. 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N-2) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* **13**:623-645.
- Cornelissen, J. H. C., S. Lavorel, E. Garnier, S. Diaz, N. Buchmann, D. E. Gurvich, P. B. Reich, H. ter Steege, H. D. Morgan, M. G. A. van der Heijden, J. G. Pausas, and H. Poorter. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal Of Botany* **51**:335-380.
- Craine, J. M., J. Froehle, G. D. Tilman, D. A. Wedin, and F. S. Chapin. 2001. The relationships among root and leaf traits of 76 grassland species and relative abundance along fertility and disturbance gradients. *Oikos* **93**:274-285.
- Craine, J. M., W. G. Lee, W. J. Bond, R. J. Williams, and L. C. Johnson. 2005. Environmental constraints on a global relationship among leaf and root traits of grasses. *Ecology* **86**:12-19.

- Craine, J. M., D. Tilman, D. Wedin, P. Reich, M. Tjoelker, and J. Knops. 2002. Functional traits, productivity and effects on nitrogen cycling of 33 grassland species. *Functional Ecology* **16**:563-574.
- De Deyn, G. B., J. H. C. Cornelissen, and R. D. Bardgett. 2008. Plant functional traits and soil carbon sequestration in contrasting biomes. *Ecology Letters* **11**:516-531.
- de Vries, F. T., P. Manning, J. R. B. Tallowin, S. R. Mortimer, E. S. Pilgrim, K. A. Harrison, P. J. Hobbs, H. Quirk, B. Shipley, J. H. C. Cornelissen, J. Kattge, and R. D. Bardgett. 2012. Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecology Letters* **15**:1230-1239.
- Drewry, J. J. 2006. Natural recovery of soil physical properties from treading damage of pastoral soils in New Zealand and Australia: A review. *Agriculture Ecosystems & Environment* **114**:159-169.
- Elser, J. J., M. E. S. Bracken, E. E. Cleland, D. S. Gruner, W. S. Harpole, H. Hillebrand, J. T. Ngai, E. W. Seabloom, J. B. Shurin, and J. E. Smith. 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **10**:1135-1142.
- Eskelinen, A., S. Stark, and M. Mannisto. 2009. Links between plant community composition, soil organic matter quality and microbial communities in contrasting tundra habitats. *Oecologia* **161**:113-123.
- Fierer, N. and R. B. Jackson. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **103**:626-631.
- Fontaine, S. and S. Barot. 2005. Size and functional diversity of microbe populations control plant persistence and long-term soil carbon accumulation. *Ecology Letters* **8**:1075-1087.
- Freschet, G. T., J. H. C. Cornelissen, R. S. P. van Logtestijn, and R. Aerts. 2010. Evidence of the 'plant economics spectrum' in a subarctic flora. *Journal Of Ecology* **98**:362-373.
- Garnier, E., J. Cortez, G. Billes, M. L. Navas, C. Roumet, M. Debussche, G. Laurent, A. Blanchard, D. Aubry, A. Bellmann, C. Neill, and J. P. Toussaint. 2004. Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology* **85**:2630-2637.
- Garnier, E. and M. L. Navas. 2012. A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**:365-399.
- Griffiths, B. S., K. Ritz, N. Ebbelwhite, and G. Dobson. 1999. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology & Biochemistry* **31**:145-153.
- Grigulis, K., S. Lavorel, U. Krainer, N. Legay, C. Baxendale, M. Dumont, E. Kastl, C. Arnoldi, R. D. Bardgett, F. Poly, T. Pommier, M. Schlöter, U. Tappeiner, M. Bahn, and J.-C. Clément. 2013. Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services. *Journal Of Ecology* **101**:47-57.
- Grime, J. P. 1977. Evidence For Existence Of 3 Primary Strategies In Plants And Its Relevance To Ecological And Evolutionary Theory. *American Naturalist* **111**:1169-1194.
- Grime, J. P. 1998. Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal Of Ecology* **86**:902-910.
- Harrison, K. A., R. Bol, and R. D. Bardgett. 2008. Do plant species with different growth strategies vary in their ability to compete with soil microbes for chemical forms of nitrogen? *Soil Biology & Biochemistry* **40**:228-237.
- Hawkins, B. A., R. Field, H. V. Cornell, D. J. Currie, J. F. Guegan, D. M. Kaufman, J. T. Kerr, G. G. Mittelbach, T. Oberdorff, E. M. O'Brien, E. E. Porter, and J. R. G. Turner. 2003. Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. *Ecology* **84**:3105-3117.
- Henry, S., S. Texier, S. Hallet, D. Bru, C. Dambreville, D. Cheneby, F. Bizouard, J. C. Germon, and L. Philippot. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environmental Microbiology* **10**:3082-3092.
- Hooper, D. U., F. S. Chapin, J. J. Ewel, A. Hector, P. Inchausti, S. Lavorel, J. H. Lawton, D. M. Lodge, M. Loreau, S. Naeem, B. Schmid, H. Setälä, A. J. Symstad, J. Vandermeer, and D. A. Wardle. 2005.

- Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* **75**:3-35.
- Kaye, J. P. and S. C. Hart. 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends In Ecology & Evolution* **12**:139-143.
- Klump, K. and J. F. Soussana. 2009. Using functional traits to predict grassland ecosystem change: a mathematical test of the response-and-effect trait approach. *Global Change Biology* **15**:2921-2934.
- Kuzyakov, Y. 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:425-448.
- Kuzyakov, Y. and X. Xu. 2013. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist* **198**:656-669.
- Laliberte, E. and J. M. Tylianakis. 2012. Cascading effects of long-term land-use changes on plant traits and ecosystem functioning. *Ecology* **93**:145-155.
- Laughlin, D. C. 2011. Nitrification is linked to dominant leaf traits rather than functional diversity. *Journal Of Ecology* **99**:1091-1099.
- Lavorel, S. and E. Garnier. 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* **16**:545-556.
- Le Roux, X., F. Poly, P. Currey, C. Commeaux, B. Hai, G. W. Nicol, J. I. Prosser, M. Schloter, E. Attard, and K. Klump. 2008. Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *Isme Journal* **2**:221-232.
- Leininger, S., T. Urich, M. Schloter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster, and C. Schleper. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**:806-809.
- Lienin, P. and M. Kleyer. 2012. Plant trait responses to the environment and effects on ecosystem properties. *Basic And Applied Ecology* **13**:301-311.
- Maire, V., N. Gross, L. D. S. Pontes, C. Picon-Cochard, and J. F. Soussana. 2009. Trade-off between root nitrogen acquisition and shoot nitrogen utilization across 13 co-occurring pasture grass species. *Functional Ecology* **23**:668-679.
- Michelsen, A., E. Graglia, I. K. Schmidt, S. Jonasson, D. Sleep, and C. Quarmby. 1999. Differential responses of grass and a dwarf shrub to long-term changes in soil microbial biomass C, N and P following factorial addition of NPK fertilizer, fungicide and labile carbon to a heath. *New Phytologist* **143**:523-538.
- Miller, A. E. and W. D. Bowman. 2002. Variation in nitrogen-15 natural abundance and nitrogen uptake traits among co-occurring alpine species: do species partition by nitrogen form? *Oecologia* **130**:609-616.
- Miller, A. E. and W. D. Bowman. 2003. Alpine plants show species-level differences in the uptake of organic and inorganic nitrogen. *Plant And Soil* **250**:283-292.
- Miller, R. M., S. P. Miller, J. D. Jastrow, and C. B. Rivetta. 2002. Mycorrhizal mediated feedbacks influence net carbon gain and nutrient uptake in *Andropogon gerardii*. *New Phytologist* **155**:149-162.
- Mokany, K., J. Ash, and S. Roxburgh. 2008. Functional identity is more important than diversity in influencing ecosystem processes in a temperate native grassland. *Journal Of Ecology* **96**:884-893.
- Ordóñez, J. C., P. M. van Bodegom, J. P. M. Witte, I. J. Wright, P. B. Reich, and R. Aerts. 2009. A global study of relationships between leaf traits, climate and soil measures of nutrient fertility. *Global Ecology and Biogeography* **18**:137-149.
- Orwin, K. H., S. M. Buckland, D. Johnson, B. L. Turner, S. Smart, S. Oakley, and R. D. Bardgett. 2010. Linkages of plant traits to soil properties and the functioning of temperate grassland. *Journal Of Ecology* **98**:1074-1083.
- Pausch, J., J. Tian, M. Riederer, and Y. Kuzyakov. 2013. Estimation of rhizodeposition at field scale: upscaling of a C-14 labeling study. *Plant And Soil* **364**:273-285.

- Phillips, R. P., E. S. Bernhardt, and W. H. Schlesinger. 2009. Elevated CO₂ increases root exudation from loblolly pine (*Pinus taeda*) seedlings as an N-mediated response. *Tree Physiology* **29**:1513-1523.
- Pohl, M., R. Stroude, A. Buttler, and C. Rixen. 2011. Functional traits and root morphology of alpine plants. *Annals Of Botany* **108**:537-545.
- Quetier, F., A. Thebault, and S. Lavorel. 2007. Plant traits in a state and transition framework as markers of ecosystem response to land-use change. *Ecological Monographs* **77**:33-52.
- Robinson, D., A. Hodge, B. S. Griffiths, and A. H. Fitter. 1999. Plant root proliferation in nitrogen-rich patches confers competitive advantage. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **266**:431-435.
- Robson, T. M., F. Baptist, J. C. Clement, and S. Lavorel. 2010. Land use in subalpine grasslands affects nitrogen cycling via changes in plant community and soil microbial uptake dynamics. *Journal Of Ecology* **98**:62-73.
- Rooney, D. C. and N. J. W. Clipson. 2009. Phosphate Addition and Plant Species Alters Microbial Community Structure in Acidic Upland Grassland Soil. *Microbial Ecology* **57**:4-13.
- Roumet, C., C. Picon-Cochard, L. A. Dawson, R. Joffre, R. Mayes, A. Blanchard, and M. J. Brewer. 2006a. Quantifying species composition in root mixtures using two methods: near-infrared reflectance spectroscopy and plant wax markers. *New Phytologist* **170**:631-638.
- Roumet, C., C. Urcelay, and S. Diaz. 2006b. Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytologist* **170**:357-368.
- Schumacher, J. and C. Roscher. 2009. Differential effects of functional traits on aboveground biomass in semi-natural grasslands. *Oikos* **118**:1659-1668.
- Tasser, E. and U. Tappeiner. 2002. Impact of land use changes on mountain vegetation. *Applied Vegetation Science* **5**:173-184.
- Tjoelker, M. G., J. M. Craine, D. Wedin, P. B. Reich, and D. Tilman. 2005. Linking leaf and root trait syndromes among 39 grassland and savannah species. *New Phytologist* **167**:493-508.
- Urcelay, C., S. Diaz, D. E. Gurvich, F. S. Chapin, E. Cuevas, and L. S. Dominguez. 2009. Mycorrhizal community resilience in response to experimental plant functional type removals in a woody ecosystem. *Journal Of Ecology* **97**:1291-1301.
- Vale, M., C. Nguyen, E. Dambrine, and J. L. Dupouey. 2005. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. *Soil Biology & Biochemistry* **37**:2329-2333.
- van der Heijden, M. G. A., R. D. Bardgett, and N. M. van Straalen. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**:296-310.
- van der Heijden, M. G. A., R. Streitwolf-Engel, R. Riedl, S. Siegrist, A. Neudecker, K. Ineichen, T. Boller, A. Wiemken, and I. R. Sanders. 2006. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist* **172**:739-752.
- Van der Krift, T. A. J., P. J. Kuikman, F. Moller, and F. Berendse. 2001. Plant species and nutritional-mediated control over rhizodeposition and root decomposition. *Plant And Soil* **228**:191-200.
- van der Putten, W. H., R. D. Bardgett, P. C. de Ruiter, W. H. G. Hol, K. M. Meyer, T. M. Bezemer, M. A. Bradford, S. Christensen, M. B. Eppinga, T. Fukami, L. Hemerik, J. Molofsky, M. Schadler, C. Scherber, S. Y. Strauss, M. Vos, and D. A. Wardle. 2009. Empirical and theoretical challenges in aboveground-belowground ecology. *Oecologia* **161**:1-14.
- Verhamme, D. T., J. I. Prosser, and G. W. Nicol. 2011. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *Isme Journal* **5**:1067-1071.
- Wardle, D. A. 1992. A COMPARATIVE-ASSESSMENT OF FACTORS WHICH INFLUENCE MICROBIAL BIOMASS CARBON AND NITROGEN LEVELS IN SOIL. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **67**:321-358.
- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. van der Putten, and D. H. Wall. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**:1629-1633.

- Warembourg, F. R. and H. D. Estelrich. 2001. Plant phenology and soil fertility effects on below-ground carbon allocation for an annual (*Bromus madritensis*) and a perennial (*Bromus erectus*) grass species. *Soil Biology & Biochemistry* **33**:1291-1303.
- Wright, D. P., D. J. Read, and J. D. Scholes. 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* **21**:881-891.

